

**Entwicklung und Optimierung eines biotechnischen
Prozesses zur Herstellung von Butanol mit
*Clostridium saccharoperbutylacetonicum***

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Christian Kaufmann
aus Mühlhausen in Thüringen

1. Referent: Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop
2. Referent: Prof. Dr. Adrian Schumpe
Eingereicht am: 28.05.2014
mündliche Prüfung (Disputation) am: 08.09.2014

Druckjahr 2014

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| BEGRIFFS UND ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 1 |
| ABBILDUNGSVERZEICHNIS | 4 |
| TABELLENVERZEICHNIS | 9 |
| 1 EINLEITUNG | 10 |
| 1.1 BUTANOL | 11 |
| 1.2 GESCHICHTE DER ABE-FERMENTATION | 12 |
| 1.3 MARKTSITUATION | 13 |
| 1.4 FERMENTATIONSPROZESS | 14 |
| 1.5 FERMENTATIONSVERFAHREN | 15 |
| 1.6 STOFFWECHSELWEG | 16 |
| 1.6.1 Bedeutung der Reduktionsäquivalente | 18 |
| 1.7 TOXIZITÄT - EINFLUSS VON BUTANOL AUF ZELLEN | 19 |
| 1.8 CHANCEN UND HERAUSFORDERUNGEN DES ABE-PROZESSES | 21 |
| 1.9 LÖSUNGSANSÄTZE FÜR EINEN EFFIZIENTEREN ABE-PROZESS | 22 |
| 1.9.1 Screening nach butanoltoleranten Stämmen | 22 |
| 1.9.2 Metabolic Engineering | 22 |
| 1.9.3 Umgehen der Produkttoxizität durch Produktabtrennung | 22 |
| 1.10 AKTUELLE BEISPIELE INDUSTRIELLER AKTIVITÄTEN ZUR FERMENTATIVEN BUTANOL-HERSTELLUNG | 24 |
| 1.11 ZIELSETZUNG DER ARBEIT | 25 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN | 26 |
| 2.1 ARBEITEN UNTER ANOXISCHEN BEDINGUNGEN | 26 |
| 2.1.1 Redoxindikator | 26 |
| 2.1.2 Reduktionsmittel | 27 |
| 2.2 FERMENTATIONSSTAMM | 29 |
| 2.3 MEDIEN | 30 |
| 2.4 STAMMHALTUNG | 32 |
| 2.4.1 Anlegen einer Kryokultur | 32 |
| 2.4.2 Induktion der Sporenbildung | 33 |
| 2.5 VORKULTUR | 34 |
| 2.6 TESTVERSUCHE IN MIKROTITERPLATTEN | 34 |
| 2.7 VERSUCHE IM VIALMAßSTAB | 34 |
| 2.7.1 Allgemeine Probenaufbereitung (für alle Maßstäbe angewendet) | 35 |
| 2.8 SUBSTRATTESTS | 36 |
| 2.8.1 Mono und Disaccharide | 36 |
| 2.8.2 Glycerin | 36 |
| 2.8.3 Galacturonsäure | 37 |
| 2.8.4 Rohsubstrate | 37 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.8.4.1 | Weizenkaff, Weizenkleie, Orangenschale und ausgelaugte/entpektinisierte Orangenschale | 37 |
| 2.8.4.2 | Weizenkaff-Hydrolysat | 38 |
| 2.8.4.3 | Zuckerrübe | 39 |
| 2.9 | VERSUCHE IN 100-ML-SCHRAUBGLASFLASCHEN MIT UND OHNE GASFREISETZUNG BZW. RÜHRUNG..... | 40 |
| 2.10 | VERSUCHE IM REAKTORMAßSTAB | 42 |
| 2.10.1 | <i>Aufbau</i> | 42 |
| 2.10.2 | <i>Immobilisierung des Biokatalysators C. saccharoperbutylacetonicum in LentiKats®</i> ... | 47 |
| 2.10.3 | <i>Langzeitversuch im repeated-Batch</i> | 49 |
| 2.10.4 | <i>Extraktionsmittel-Toxizitätstest</i> | 51 |
| 2.10.5 | <i>600-mL-Fed-Batch-Fermentation und in situ-Extraktion mit 900 mL Isofol®12</i> | 51 |
| 2.11 | ANALYTIK..... | 54 |
| 2.11.1 | <i>Bestimmung der Zelldichte mit Hilfe der optischen Dichte und der Biotrockenmasse</i> ... | 54 |
| 2.11.2 | <i>Mikroskopische Untersuchungen</i> | 56 |
| 2.11.3 | <i>Flüssigkeitschromatographie</i> | 57 |
| 2.11.4 | <i>Gaschromatographie</i> | 57 |
| 2.11.4.1 | Analyse der Gase im Gasraum (H ₂ , CO ₂ , N ₂)..... | 57 |
| 2.11.4.2 | Analyse der Fermentationsprodukte Aceton, Butanol, Ethanol in Isofol® 12..... | 58 |
| 3 | ERGEBNISSE UND DISKUSSION | 60 |
| 3.1 | TESTVERSUCHE IN MIKROTITERPLATTEN..... | 60 |
| 3.2 | OPTIMIERUNG DES START-PH-WERTES | 60 |
| 3.3 | MEDIENOPTIMIERUNG UND ANPASSUNG DER FERMENTATIONSPARAMETER | 62 |
| 3.3.1 | <i>Einfluss von Trypton, Be- und Entgasung oder Durchmischung auf die Produktbildung</i> | 62 |
| 3.3.1.1 | Einfluss von Trypton im Vialversuch..... | 62 |
| 3.3.1.2 | Einfluss von Trypton im Reaktorversuch | 63 |
| 3.3.1.3 | Zusammensetzung der Gasphase im Vialversuch | 67 |
| 3.3.1.4 | Einfluss von Durchmischung und Gasfreisetzung in Abhängigkeit von Trypton..... | 68 |
| 3.3.1.5 | Einfluss der Durchmischungsart | 70 |
| 3.3.2 | <i>Einfluss der H₂-Begasung im Reaktor</i> | 72 |
| 3.3.3 | <i>Vergleich der Fermentationen mit H₂-Begasung oder Überdruck</i> | 73 |
| 3.3.4 | <i>Einfluss von Ammonium und Acetat auf die Produktbildung</i> | 76 |
| 3.3.5 | <i>Einfluss von Hefeextrakt auf die Produktbildung</i> | 77 |
| 3.3.6 | <i>Optimierung der Inkubationstemperatur in Vials und im Reaktor</i> | 78 |
| 3.3.6.1 | Einfluss der Inkubationstemperatur im Vialversuch | 78 |
| 3.3.6.2 | Einfluss der Inkubationstemperatur im Reaktorversuch..... | 80 |
| 3.4 | BUTANOLTOXIZITÄT BEI C. SACCHAROPERBUTYLACETONICUM..... | 81 |
| 3.5 | VERWERTBARKEIT VERSCHIEDENER SUBSTRATE | 82 |
| 3.5.1 | <i>Mono- und Disaccharide</i> | 82 |
| 3.5.2 | <i>Glycerin</i> | 84 |
| 3.5.3 | <i>Galacturonsäure</i> | 85 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|---------|---|-----|
| 3.5.4 | <i>Rohsubstrate</i> | 86 |
| 3.5.4.1 | Weizenkaff, Weizenkleie, Orangenschale, entpektinisierte Orangenschale | 86 |
| 3.5.4.2 | Weizenkaff-Hydrolysat | 89 |
| 3.5.4.3 | Zuckerrübe | 90 |
| 3.6 | INDUKTION DER SPORENBILDUNG VON <i>CLOSTRIDIUM SACCHAROPERBUTYLACETONICUM</i> N1-4..... | 92 |
| 3.7 | LANGZEITFERMENTATION ALS REPEATED-BATCH | 93 |
| 3.8 | <i>IN SITU</i> -FLÜSSIG-FLÜSSIG-EXTRAKTION DER ENDPRODUKTE..... | 100 |
| 3.8.1 | <i>Extraktionsmitteltest mit C. saccharoperbutylaceticum für die in situ-flüssig-flüssig-Extraktion</i> | 100 |
| 3.8.2 | <i>Auswirkungen der Glucose-Startkonzentration auf die Butanolproduktion</i> | 103 |
| 3.8.3 | <i>Fermentation mit in situ-flüssig-flüssig-Extraktion (Isofol®12)</i> | 104 |
| 3.8.3.1 | Fermentation ohne Gasumwälzung | 105 |
| 3.8.3.2 | Vergleich der beiden Reaktoren mit und ohne Gasumwälzung bei der Fermentation mit in situ-flüssig-flüssig-Extraktion..... | 109 |
| 4 | ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK | 111 |
| 5 | QUELLENVERZEICHNIS | 114 |
| 6 | ANHANG | 124 |
| 6.1 | ABBILDUNG ZUM TEMPERATURVERSUCH IM REAKTOR..... | 124 |
| 6.2 | ABBILDUNG ZUM GASPHASEN-VERSUCH..... | 124 |
| 6.3 | BESTANDTEILE DER SYNTHETISCHEN MODELLLÖSUNG | 125 |
| 6.4 | ABBILDUNG ZUR LANGZEITFERMENTATION IM REPEATED-BATCH | 125 |
| 6.5 | VERWENDETE GERÄTE | 128 |
| 6.6 | CHEMIKALIEN | 130 |
| | DANKSAGUNG | 133 |

Begriffs und Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|---|
| A-Bank | <u>A</u> naerobier-Bank oder Glovebox für Arbeiten unter anoxischen Bedingungen mit N ₂ /H ₂ -Atmosphäre (95%/5%) |
| ABE | <u>A</u> ceton, <u>B</u> utanol, <u>E</u> thanol |
| anaerob | Lebensweise (Stoffwechsel) ohne O ₂ |
| anoxisch | O ₂ -freie Umweltbedingungen oder Systeme mit niedrigem Redoxpotential in denen nur anaerobe Organismen leben können |
| ATP | Adenosin-tri-phosphat |
| ATPase | Enzym, dass durch den Abbau von ATP zu ADP und Phosphat Energie freisetzt oder den Aufbau aus ADP und Phosphat unter Energieverbrauch zu ATP ermöglicht. |
| Batch-Ansatz | alle Medienbestandteile werden in einem Gefäß vorgelegt, inokuliert und inkubiert |
| Repeated-Batch-Ansatz | Batch-Ansatz der durch (teilweisen) Medienwechsel mit den Zellen oder einem Teil der Zellen aus dem vorigen Ansatz weitergeführt wird |
| BTM | <u>B</u> io <u>t</u> rocken <u>m</u> asse |
| <i>C. spba.</i> | <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> N 1-4 (DSM 14923) |
| CME | <u>C</u> ellulose <u>m</u> isch <u>e</u> ster |
| ECD | <u>e</u> lectron <u>c</u> apture <u>d</u> etector (Elektronenfänger Detektor) |
| Ertrag | in $\text{g}_{\text{Produkt}} \cdot \text{g}_{\text{Substrat}}^{-1}$ oder in % des eingesetzten Substrates angegeben |
| Fed-Batch-Ansatz | Batch-Ansatz, bei dem Substrate und Co-Substrate bei Bedarf zugegeben werden |
| Ferredoxine | Eisen-Schwefel-Proteine, die in eukaryotischen und bakteriellen Zellen als Elektronenüberträger fungieren |
| FID | <u>F</u> lammen <u>i</u> onisations <u>d</u> etektor |
| Formiergas | Gasgemisch aus 95 % N ₂ und 5 % H ₂ für die Umwandlung von Rest-O ₂ zu H ₂ O an einem Palladium-Katalysator in einer A-Bank |
| FPU | <u>f</u> ilter <u>p</u> aper <u>u</u> nit |
| g | Erdbeschleunigung: $\sim 9,81 \text{ m} \cdot \text{s}^{-2}$ |

Begriffs und Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------------|--|
| GC | <u>G</u> as <u>c</u> hromatograph(ie) |
| h | Stunden |
| Headspace | Gasphase in Inkubationsgefäßen (Vial, Reaktor) |
| HPLC | Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (<u>h</u> igh <u>p</u> erformance <u>l</u> iquide <u>c</u> hromatography) |
| Hydrogenase | Enzym, dass die Oxidation und Reduktion von H ₂ katalysiert |
| Isofol®12 | 2-Butyloctan-1-ol (>97 %) |
| Isofol®14T | Gemisch aus 2-Butyloctanol, 2-Butyldecanol, 2-Hexyloctanol und 2-Hexyldecanol |
| Isofol®16 | 2-Hexyldecanol (>97 %) |
| Isofol®20 | 2-Octyldodecanol (>97 %) |
| Kaff | Spreu (Spelzen, Schalen, Grannen, Stängelteile) des Getreides |
| Kleie | entsteht bei der Mehlerzeugung und ist der Rückstand nach Absieben des Mehls |
| Kordit | Explosivstoff aus Nitrocellulose, Nitroglycerin, Vaseline und Aceton |
| LentiKat® | linsenförmige Matrix aus Polyvinylalcohol, zur Einschlussimmobilisierung von Zellen |
| Metabolic Engineering | Deregulierung oder Transfer von Biosynthesewegen zur Steigerung der Produktion gewünschter Produkte oder zur Verhinderung unerwünschter Produkte |
| Mio. | Millionen |
| MTP(s) | <u>M</u> ikro <u>t</u> iter <u>p</u> latte(n) |
| Mrd. | Milliarden |
| NAD(P) | <u>N</u> icotinamid <u>a</u> denin <u>d</u> inukleotid(<u>p</u> hosphat) |
| n.d. | nicht definiert |
| OD ₅₃₅ | <u>o</u> ptische <u>D</u> ichte gemessen bei 535 nm |
| PP | <u>P</u> oly <u>p</u> ropylen |
| Produktivität | gebildete Produktmenge pro Zeit [g(L·h) ⁻¹] |
| PVA | <u>P</u> oly <u>v</u> inyl <u>a</u> lcohol |
| RCM | <u>r</u> einforced <u>c</u> lostridia <u>m</u> edium |
| RI | <u>r</u> efraction <u>i</u> ndex (Brechungsindex) |

Begriffs und Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------|---|
| sML | synthetische Medienlösung |
| TCD (WLD) | <u>t</u> hermal <u>c</u> onductivity <u>d</u> etector (<u>W</u> ärme <u>l</u> eit <u>f</u> ähigkeits <u>d</u> etektor) |
| Vial | Glasfläschchen |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-------------------|--|----|
| Abbildung 1.1.1: | Darstellung der Oxosynthese zur industriellen Herstellung von Butanol aus Propen an einem Rhodium-Katalysator | 10 |
| Abbildung 1.6.1: | Metabolismus solventogener Clostridien, Säurebildungsphase (rot) Lösungsmittelbildungsphase (grün), Energiegewinnung in Form von ATP (blau, gepunktet), Elektronen-Transportvorgänge (gelb), verändert nach YU ET AL. 2011 und GARCIA ET AL. 2011 | 17 |
| Abbildung 1.7.1: | Verhalten und Transport von unpolaren, lipophilen Lösungsmitteln • an einer Phospholipid-Membran am Beispiel von <i>Pseudomonas putida</i> , Pfeile zeigen mögliche Bewegungsrichtungen des Lösungsmittels in, an und durch die Membran bzw. Membranproteine an; verändert nach DE BONT 1998 und RÜHL ET AL. 2009..... | 20 |
| Abbildung 2.1.1: | Reaktion des blauen Redoxindikators Resazurin zu farblosem Dihydroresorufin | 27 |
| Abbildung 2.1.2: | Reaktion des als Reduktionsmittel verwendeten L-Cystein zu L-Cystin durch Ausbildung von Disulfidbrücken | 27 |
| Abbildung 2.1.3: | Anaerobisierungsanlage nach NEUMANN [1993] mit angeschlossenem 1 L Probengefäß geschützt in einem Laborabzug | 29 |
| Abbildung 2.4.1: | Thoma Zählkammer ($0,02 \text{ mm} \cdot 0,0025 \text{ mm}^2$), Auszählen von 8 Großquadraten á 16 Kleinquadrate mit je $0,0025 \text{ mm}^2$, ein Kleinquadrat entspricht einem Volumen von $5 \cdot 10^{-5} \mu\text{L}$ | 33 |
| Abbildung 2.8.1: | Im Vialversuch eingesetzte Rohsubstrate, zerkleinert und getrocknet sowie die bei 27°C inkubierten 30-mL-Ansätze mit YA-Medium und 50 g/L des jeweiligen Substrats | 38 |
| Abbildung 2.8.2: | Weizenkaff unbehandelt (A), nach Organosolv Vorbehandlung (B), nach enzymatischer Hydrolyse mit 10 FPU Biogazyme 2x, ausgepresst (C), 20-mL-Vialansatz mit Weizenkaff-Hydrolysat und YA-Medium (D) | 38 |
| Abbildung 2.8.3: | Zerkleinerte, autoklavierte Zuckerrübe (A), YA-Medium mit 100 g/L Zuckerrübe (B), bei 27°C inkubierter Zuckerrübenansatz (C) | 40 |
| Abbildung 2.9.1: | 100 mL Schraubglasflaschen mit gasdichten Butylgummistopfen und Magnetrührstäbchen, die Gärröhrchen dienten zum Entweichen der Gase aus den 60 mL Kulturen..... | 41 |
| Abbildung 2.10.1: | Verwendete Glasreaktoren mit 150 mL (A), 500 mL (B) und 1000 mL (C) Arbeitsvolumen..... | 42 |
| Abbildung 2.10.2: | Schematische Darstellung der Reaktoren vor der Optimierung (A) mit Be- und Entgasung sowie nach der Optimierung (B) mit Gärröhrchen und Druckbegrenzungsventil zur Gasrückhaltung. | 45 |
| Abbildung 2.10.3: | Optimiertes Doppelfermentersystem mit 150 mL Reaktoren (Kultivierung mit Lentikats® und freien Zellen) | 46 |
| Abbildung 2.10.4: | LentiKat®Printer zum Drucken von 400 LentiKats® gleichzeitig [JAHNZ 2000]..... | 48 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-------------------|--|----|
| Abbildung 2.10.5: | Auflichtmikroskopische Aufnahme eines LentiKats® mit, durch Carbol-Fuchsin angefärbten Kolonien, Carl Zeiss Stemi SV8, nach 1000 h, Messbalken entspricht 500 µm | 49 |
| Abbildung 2.10.6: | 150 mL Batch-Reaktoren im Langzeitversuch mit LentiKats® (A) und freien Zellen (B) in YA-Glucose-Medium, 27 °C, 300 RPM..... | 50 |
| Abbildung 2.10.7: | Mikroskopische Aufnahmen der mit Carbol-Fuchsin gefärbten Kolonien in LentiKats® aus dem Langzeitversuch nach 1000 h, (A) Zeiss Axioplan, Auflicht, Messbalken = 200 µm; (B) Zeiss Stemi SV8, Durchlicht, Messbalken = 500 µm | 51 |
| Abbildung 2.10.8: | Optimiertes Doppel-Fermentersystem mit analoger Datenaufnahme, 1000-mL-Reaktoren, (nach dem Totautoklavieren der 2-Phasen-Fermentation zur <i>in situ</i> -Extraktion, ohne (A) und mit (B) Gasraum-Gasumwälzung) | 52 |
| Abbildung 2.10.9: | Schematische Darstellung der optimierten Reaktoren aus der 2-Phasen-Fermentation zur <i>in situ</i> -Extraktion, ohne (A) und mit (B) Gasraum-Gasumwälzung | 53 |
| Abbildung 2.11.1: | Korrelation der optischen Dichte (OD) zu Biotrockenmasse (BTM) aus Kultivierungen mit <i>C. spba.</i> in YA-Glucose-Medium | 55 |
| Abbildung 3.2.1: | Butanolkonzentration (A), optische Dichte (B) und pH-Werte (C) über die Zeit im Inkubationsversuch mit <i>C. spba.</i> in 50-mL-Vials und TYA-Medium mit 50 g/L Glucose bei 30 °C | 61 |
| Abbildung 3.3.1: | Endkonzentrationen nach 150 h in 50-mL-Vials mit 30 mL TYA- oder YA-Medium und 50 g/L Glucose als 3-fach-Ansatz, inkubiert bei 30 °C, Start-pH-Wert: 6,3 | 63 |
| Abbildung 3.3.2: | Zeitliche Verläufe der Substrat- und Produktkonzentrationen, des pH-Wertes und der OD ₅₃₅ einer Batch-Fermentation mit <i>C. spba.</i> in 500-mL-Reaktoren mit 400 mL TYA- (A) oder YA-Medium (B) und 50 g/L Glucose als Substrat. Inkubation bei 30 °C mit N ₂ -Begasung und Rührung (500 RPM), Start-pH-Wert: 6,3 (ungeregelt) | 64 |
| Abbildung 3.3.3: | Endkonzentrationen nach 120 h in 20-mL-Vials mit 10 mL TYA- oder YA-Medium und 20 g/L Glucose als Doppelansatz, mit identischem Inokulum zum Versuch in Abbildung 3.3.2, inkubiert bei 30 °C, Start-pH-Wert: 6,3 | 65 |
| Abbildung 3.3.4: | Verteilung prozentualer Anteile der Gase im Gasraum N ₂ , CO ₂ und H ₂ über die Zeit im Vialversuch mit TYA-Medium und 40 g/L Glucose. Die 40 mL 3-fach-Ansätze wurden in 100-mL-Vials bei 30 °C inkubiert, Start-pH-Wert: 6,5. | 67 |
| Abbildung 3.3.5: | Endkonzentrationen von <i>C. spba.</i> in gasdichten 100 mL Schraubflaschen mit 60 mL TYA- bzw. YA-Medium und 20 g/L Glucose bei 30 °C nach 114 h Inkubation; stehend (0 RPM), gerührt (250 RPM), offen (über Gärröhrchen), Start-pH-Werte TYA: 6,8; YA: 6,7 | 69 |
| Abbildung 3.3.6: | Endkonzentrationen von <i>C. spba.</i> in gasdichten 100 mL Schraubflaschen mit 60 mL YA-Medium und 20 g/L Glucose bei 30 °C nach 168 h Inkubation, stehend (0 RPM), geschüttelt (150 RPM), gerührt (150 RPM), Gasfreisetzung über Gärröhrchen, Start-pH-Wert: 6,7 | 71 |
| Abbildung 3.3.7: | Konzentrationsverläufe der Substrate und Produkte sowie OD ₅₃₅ und pH-Werte einer Fed-Batch-Parallelferrmentation mit <i>C. spba.</i> in 500-mL-Glasreaktoren mit 400 mL YA-Glucose-Medium, 30 °C Inkubationstemperatur, 200 RPM Rührung, Reaktor mit H ₂ -Begasung (A) oder ohne Begasung (B) Start-pH-Wert: 6,5 (ungeregelt) | 72 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|-------------------|--|----|
| Abbildung 3.3.8: | Konzentrationsverläufe der Substrate und Produkte sowie OD ₅₃₅ und pH-Werte einer FedBatch-Parallelfermentation mit <i>C. spba.</i> in 200 mL Glasreaktoren mit 130 mL YA-Glucose-Medium. 30 °C Inkubationstemperatur, 200 RPM Rührung, Reaktor mit H ₂ -Begasung (A) oder mit 0,2-0,3bar Überdruck (B); Start-pH-Wert: 6,5, ungeregelt | 74 |
| Abbildung 3.3.9: | Endkonzentrationen und maximale OD ₅₃₅ nach 154 h in 50-mL-Vials mit 30 mL verschiedener YA-Medienvarianten wie YA, YA-Medium ohne Ammonium (YA -NH ₄) und YA-Medium ohne Acetat (YA-Ace) jeweils mit 50 g/L Glucose, inkubiert bei 30 °C als 3-fach-Ansatz, Start-pH-Wert: 6,3 | 76 |
| Abbildung 3.3.10: | Endkonzentrationen der Produkte aus dem Inkubationsversuch mit 60 mL YA-Medium, 75 g/L Glucose und verschiedenen Hefeextrakt-Konzentrationen in 100-mL-Schraubglasflaschen mit Gärverschluss bei einer Inkubationstemperatur von 26 °C im Schüttler mit 150 RPM für 23 Tage; Hefeextrakt-Konzentrationen: 0 g/L, 1 g/L, 2 g/L; Start-pH-Wert: 6,3 | 77 |
| Abbildung 3.3.11: | Substrat- und Produkt-Endkonzentrationen sowie OD ₅₃₅ des Temperaturversuchs in 100-mL-Vials nach 19 Tagen mit <i>C. spba.</i> in 50 mL YA-Medium mit 60 g/L Glucose bei verschiedenen Inkubationstemperaturen. Start-pH-Wert: 6,3 | 79 |
| Abbildung 3.3.12: | Verlauf der Aceton- (A) und Butanolkonzentrationen (B) während einer Batch-Fermentation mit <i>C. spba.</i> in 130 mL YA-Medium und 75 g/L Glucose bei verschiedenen Temperaturen mit einem Überdruck von 0,2-0,3 bar und einer Rührung von 100 RPM. Start-pH-Wert: 6,3 | 80 |
| Abbildung 3.4.1: | Endkonzentrationen im Butanol-Toxizitätstest bei 27 °C in 50-mL-Vials mit 30 mL YA-Medium und 25 g/L Glucose sowie verschiedenen Butanolkonzentrationen für 27 Tage inkubiert; schraffierte Balken stellen die vorgelegten Butanol-Konzentrationen dar; ausgefüllte Balken stellen Endkonzentrationen dar. | 82 |
| Abbildung 3.5.1: | Berechnete Butanol- (A, C) und Aceton-Endkonzentrationen (B, D) pro eingesetztem Substrat, Vergleich verschiedener Zucker in 50-mL-Vials mit 30 mL YA-Medium, bei 30 °C, Start-pH-Wert: 6,5 | 83 |
| Abbildung 3.5.2: | Substrat und Produktkonzentrationen aus den Substrattests mit Glycerin in 30 mL YA-Medium, inkubiert in 50-mL-Vials bei 30 °C für 120 h, 3-fach-Ansatz (Standardabweichung < 0,1) | 84 |
| Abbildung 3.5.3: | Konzentrationen (A) sowie pH-Werte und OD ₅₃₅ (B) über die Zeit in YA-Medium mit Galacturonsäure als Substrat, <i>C. spba.</i> inkubierte bei 27 °C in 30-mL-Ansätze in 50-mL-Vials, 3-fach-Ansatz. | 85 |
| Abbildung 3.5.4: | Substrat und Produktkonzentrationen im Inkubationsversuch mit <i>C. spba.</i> in YA-Medium mit jeweils 50 g/L Weizenkaff, Weizenkleie, Orangenschale oder ausgelaugte Orangenschale als Substrat, inkubiert bei 30 °C für 150 h. Start-pH-Werte: 6,6-7,0..... | 87 |
| Abbildung 3.5.5: | Zucker- und Produktkonzentrationen im Inkubationsversuch mit <i>C. spba.</i> in 10 mL A- (A) und YA-Medium (B) mit Weizenkaff-Hydrolysat als Substrat inkubiert bei 27 °C in 20-mL-Vials für 120 h. Start-pH-Wert: 6,2 | 89 |
| Abbildung 3.5.6: | Gesamtzucker- und Produktkonzentrationen im Inkubationsversuch mit <i>C. spba.</i> in A- (A) und YA-Medium (B) mit 100 g/L Zuckerrübe als Substrat inkubiert bei 27 °C. 30 mL Ansätze in 50-mL-Vials. Start-pH-Wert: 6,2 | 90 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|------------------|---|
| Abbildung 3.6.1: | Zellmorphologie nach 20 Tagen von <i>C. spba.</i> aus Standkulturen in 20 mL YA-Medium mit unterschiedlichen Hefeextrakt-Konzentrationen (0 g/L; 1 g/L und 2 g/L) und 100 g/L Zuckerrübe. Phasenkontrastaufnahme, Zeiss Axioplan, 40er Objektiv, Ph2 .92 |
| Abbildung 3.7.1: | Morphologie von <i>C. spba.</i> in repeated-Batch-Fermentationen mit freien Zellen, zum Start des Batches, in exponentieller Phase und bei Abbruch des Batches, YA-Medium mit Glucose, bei 27 °C, 300 RPM und 0,2-0,3 bar; vergrößerte Ansicht ist eingerahmt (Messbalken=4 µm); Phasenkontrastaufnahme: Zeiss Axioplan, 100-fach Objektiv, Ph3, (Messbalken=20 µm), Inkubationszeit in Stunden (Batch/gesamter Versuch) ..94 |
| Abbildung 3.7.2: | Zeitlicher Verlauf der Glucose- (A) und Butanolkonzentrationen (B) im Vergleich freier und immobilisierter Zellen. Repeated-Batch-Fermentation mit <i>C. spba.</i> in YA-Glucose-Medium, bei 27 °C, 300 RPM und 0,2-0,3 bar.95 |
| Abbildung 3.7.3: | Zeitlicher Verlauf der Acetat-(A) und Acetonkonzentrationen (B) im Vergleich freier und immobilisierter Zellen. Repeated-Batch-Fermentation mit <i>C. spba.</i> -Zellen in YA-Glucose-Medium, bei 27 °C, 300 RPM und 0,2-0,3 bar.96 |
| Abbildung 3.7.4: | Zeitlicher Verlauf der pH-Werte (A) und der Ethanolkonzentrationen (B) im Vergleich freier und immobilisierter Zellen. Repeated-Batch-Fermentation mit <i>C. spba.</i> -Zellen in YA-Glucose-Medium, bei 27 °C, 300 RPM und 0,2-0,3 bar.97 |
| Abbildung 3.7.5: | Aceton- und Butanolerträge in Abhängigkeit vom Acetatverbrauch aus den repeated-Batch-Fermentationen des Langzeitversuchs mit freien (A) und immobilisierten (B) <i>C. spba.</i> Zellen in YA-Glucose-Medium, bei 27 °C, 300 RPM und 0,2-0,3 bar.98 |
| Abbildung 3.8.1: | Vials des Toxizitätstests mit je 5 mL TYA-Medium und 10 g/L Glucose, überschichtet mit jeweils 5 mL Extraktionsmittel, inkubiert bei 27 °C für mindestens 14 Tage.101 |
| Abbildung 3.8.2: | Verläufe der Glucose- und Butanolkonzentrationen in 50-mL-Vials mit 30 mL YA-Medium und verschiedenen Glucose-Startkonzentrationen in 147 h bei 30 °C.....103 |
| Abbildung 3.8.3: | Zeitliche Verläufe von pH-Wert und OD ₅₃₅ (A), Glucose- und Säurekonzentrationen (B) sowie den Konzentrationen von Butanol (C), Aceton (D) und Ethanol (E) in wässriger (□) und organischer (Δ) Phase aus der 2-Phasen-Fed-Batch-Fermentation ohne Gasumwälzung, mit YA-Glucose-Medium und Isofol®12 als Extraktionsmittel, bei 26 °C, 0,2-0,3 bar Überdruck, 200 RPM, Start-pH-Wert: 5,7 ungeregelt; (▼) Zugabe von Medium, Isofol®12 oder Substrat.....106 |
| Abbildung 3.8.4: | Substrat- und Endproduktkonzentrationen der 2-Phasen-Fed-Batch-Fermentation mit YA-Glucose-Medium und Isofol®12 als Extraktionsmittel, bei 26 °C, 0,2-0,3 bar, 200 RPM, Start-pH-Wert: 5,7 ungeregelt; Konzentrationen in der wässrigen Phase ohne (A) und mit Gasumwälzung (B); Konzentrationen der organischen Phase ohne (C) und mit Gasumwälzung (D) (siehe Abbildung 2.10.9, Seite 53)109 |
| Abbildung 6.1.1: | Verläufe der Glucosekonzentrationen in 200-mL-Reaktoren des Temperaturversuches mit YA-Medium.....124 |
| Abbildung 6.2.1: | Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen (A) sowie des pH, der OD ₅₃₅ und des Überdrucks (B) im 100-mL-Vial mit TYA-Medium und 40 g/L Glucose (B) im 100-mL-Vial mit TYA-Medium und 40 g/L Glucose, 3-fach-Ansatz124 |
| Abbildung 6.4.1: | Verlauf der BTM im Medium der repeated-Batch-Fermentationen mit freien und immobilisierten Zellen (LentiKats®)125 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| Abbildung 6.4.2: | Morphologie von <i>C. spba.</i> in repeated-Batch-Fermentationen mit freien Zellen, zum Start des Batches, in exponentieller Phase und bei Abbruch des Batches, YA-Medium mit Glucose, bei 27 °C, 300 RPM und 0,2-0,3 bar; vergrößerte Ansicht ist eingerahmt (Messbalken=4 µm); Phasenkontrastaufnahme: Zeiss Axioplan, 100-fach Objektiv, Ph3, (Messbalken=20 µm), Inkubationszeit in Stunden126 |
| Abbildung 6.4.3: | Fortsetzung Abbildung 8.4.2127 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----------------|--|-----|
| Tabelle 1.1.1: | Eigenschaften von Butanol und Ethanol im Vergleich [BASF 2008; ROTH 2013] | 11 |
| Tabelle 1.7.1: | Butanoltoleranzen einiger Organismen | 21 |
| Tabelle 2.3.1: | Komplexe Medien für Stammhaltung und Anzucht anaerober Clostridien | 30 |
| Tabelle 2.3.2: | Reduzierte Varianten des komplexen TYA-Mediums für Fermentationen | 30 |
| Tabelle 2.3.3: | Sporeninduzierendes Medium und Medium der DSMZ, mit dem keine Sporulation beobachtet werden konnte. | 31 |
| Tabelle 2.3.4: | Zusätzliche Lösungen | 31 |
| Tabelle 2.8.1: | Getestete Mono- und Disaccharide mit deren eingewogenen Konzentrationen | 36 |
| Tabelle 2.10.1: | Geräteliste des digitalen Doppelfermentersystems, grau hinterlegte Komponenten wurden im Zuge der Optimierung durch <i>kursiv</i> dargestellte Komponenten ersetzt. .43 | |
| Tabelle 2.10.2: | Geräteliste des analogen Doppelreaktorsystems, grau hinterlegte Komponenten wurden im Zuge der Optimierung durch <i>kursiv</i> dargestellte Komponenten ersetzt. | 44 |
| Tabelle 2.11.1: | Komponenten und Betriebsbedingungen des Knauer/Shimadzu-HPLC-Systems..... | 57 |
| Tabelle 2.11.2: | Komponenten und Betriebsbedingungen des Shimadzu GC-14B zur Vermessung der Gase | 58 |
| Tabelle 2.11.3: | Komponenten und Betriebsbedingungen des Shimadzu GC-14A zur Analyse der Endprodukte des ABE-Prozesses in Isofol®12 | 59 |
| Tabelle 3.1.1: | Vor- und Nachteile von Versuchen in Mikrotiterplatten mit <i>C. spba.</i> | 60 |
| Tabelle 3.3.1: | Unterschiede zwischen den Systemen Vial und Reaktor | 66 |
| Tabelle 3.8.1: | Verteilungskoeffizienten ($k_{E/W}$) von Butanol in dem jeweiligen Extraktionsmittel und H ₂ O bzw. einer synthetischen Medienlösung (sML) (siehe Tabelle 6.3.1, Seite 125) bei 25 °C sowie dem Wachstum von <i>C. spba.</i> unter Einfluss des Extraktionsmittels in 5 mL TYA-Glucose-Medium bei 27 °C in 20-mL-Vials..... | 101 |
| Tabelle 3.8.2: | Ergebnisparameter bei verschiedenen Glucose-Startkonzentrationen in 50-mL-Vials mit 30 mL YA-Medium nach 147 h bei 30 °C, Höchstwerte fettgedruckt | 104 |
| Tabelle 6.3.1: | Bestandteile der Modelllösung, pH-Wert: 6 [HELLERT 2013] | 125 |

1 Einleitung

Aufgrund des globalen Bevölkerungswachstums und dem Verlangen eines weltweit gleich hohen Lebensstandards steigt auch der Bedarf an Energie und Rohstoffen. Die bis heute von der chemischen Industrie und zur Energiegewinnung extensiv genutzten fossilen Rohstoffe gehen jedoch in absehbarer Zeit zu Neige [LIN ET AL. 2011; BP 2013]. Zur Energiegewinnung können vorrangig Technologien wie Windkraft, Solarenergie oder Wasserkraft genutzt werden. Die Produktion von Basischemikalien, welche bis dato größten Teils aus fossilen Rohstoffen hergestellt werden, wird jedoch immer problematischer. Eine Alternative zur Synthese von Basischemikalien aus fossilen Rohstoffen stellt die Biotechnologie dar. Damit können z. B. aus nachwachsenden Rohstoffen über fermentative Prozesse, mit Hilfe von Biokatalysatoren, Chemikalien hergestellt werden. Als Biokatalysatoren können Enzyme, Pilze, Algen, Archaeen oder Bakterien genutzt werden [MADIGAN ET AL. 2003c; MADIGAN ET AL. 2003b].

n-Butanol kommt eine große Bedeutung als Basischemikalie zu und wird darüber hinaus, aufgrund seiner mit Benzin vergleichbaren Eigenschaften (Tabelle 1.1.1), auch als Kraftstoffzusatz oder -substituent in Verbrennungsmotoren diskutiert. Aktuell erfolgt die Herstellung von n-Butanol, im Folgenden als Butanol bezeichnet, über die Oxosynthese (Abbildung 1.1.1) aus petrochemisch gewonnenem Propen.

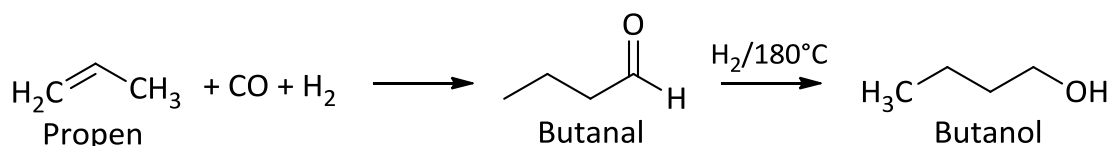


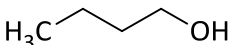
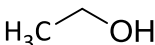
Abbildung 1.1.1: Darstellung der Oxosynthese zur industriellen Herstellung von Butanol aus Propen an einem Rhodium-Katalysator

Durch den steigenden Erdölpreis wächst wieder das Interesse an der bereits seit 1861 bekannten fermentativen Butanolproduktion [DURRE ET AL. 1992; DURRE 2008; GARCIA ET AL. 2011]. Zahlreiche Forschungslabore und Firmen widmen sich wieder der Erforschung des 1915 patentierten WEIZMANN-Prozesses.

1.1 Butanol

Butanol, ein C-4-Alkohol ist eine brennbare, farblose Flüssigkeit mit einem an Buttersäure erinnernden, charakteristischen Geruch. Bei direktem Kontakt reizt es Augen und Haut und kann bei längerem Einatmen eine narkotische Wirkung hervorrufen [BASF 2008]. In Tabelle 1.1.1 sind weitere Eigenschaften des Alkohols dargestellt.

Tabelle 1.1.1: Eigenschaften von Butanol und Ethanol im Vergleich [BASF 2008; ROTH 2013]

| Eigenschaft | Butanol | Ethanol |
|---|---|---|
| Strukturformel |  |  |
| Summenformel | C_4H_9OH | C_2H_6O |
| Molmasse [g/mol] | 74,12 | 46,07 |
| EG-Nummer | 200-751-6 | 200-578-6 |
| CAS-Nummer | 71-36-3 | 64-17-5 |
| Schmelzpunkt [°C] | -89 | -114 |
| Siedepunkt [°C] | 116-118 | 78 |
| Energiedichte [MJ/L] | 29 | 21 |
| Flammpunkt [°C] | 35 | 12 |
| Zündtemperatur [°C] | 365 | 425 |
| Dichte (20 °C) [g/mL] | 0,81 | 0,79 |
| Löslichkeit in H ₂ O (20 °C) [g/L] | 77 | mischbar |

Butanol stellt sowohl ein wichtiges Lösungsmittel, als auch eine wichtige Basischemikalie für die Synthese verschiedener Folgeprodukte dar. Diese finden hauptsächlich als Butylacetat, Butylacrylat oder andere Ester in Farben, Lacken, Klebstoffen oder als Weichmacher in Kunststoffen Verwendung [JONES & WOODS 1986; DURRE 2008]. Als Kraftstoff oder Kraftstoffzusatz in Verbrennungsmotoren hat Butanol entscheidende Vorteile gegenüber Ethanol (Tabelle 1.1.1), bezüglich Energiedichte, Sicherheit und Nutzbarkeit bestehender Infrastrukturen. Um biotechnisch hergestelltes Butanol zur Verbrennung und Energiegewinnung nutzen zu können,

müssten weitreichende Verbesserungen des Herstellungsprozesses erzielt werden, damit eine nachhaltige und kostengünstige Produktion gewährleistet wäre.

1.2 Geschichte der ABE-Fermentation

Die fermentative Butanolbildung durch Mikroorganismen wurde erstmals 1861, also vor 153 Jahren, durch LOUIS PASTEUR entdeckt [PASTEUR 1862]. 1905 berichtete SCHARDINGER von der Acetonbildung durch Fermentation mit *Bacillus macerans*. CHARLES WEIZMANN entwickelte 1915 einen ABE-Prozess, der in England patentiert (britisches Patent 4845) wurde, wonach dieser ein Jahr später bis 1918 in der industriellen Acetonproduktion Anwendung fand. Aceton diente im ersten Weltkrieg zur Herstellung von Kordit, einem Explosivstoff aus Zellulosenitrat, Nitroglycerin, Vaseline und Aceton, der als raucharmes Schießpulver verwendet wurde. In diesem Prozess wurden lösungsmittelbildende (solventogene) Clostridien als Biokatalysator verwendet, die dadurch charakterisiert sind, Lösungsmittel wie Aceton, Butanol, Iso-Propanol oder Ethanol aus zucker- oder stärkehaltigen Substraten (z.B. Melasse oder Kartoffeln) zu produzieren. [WEIZMANN 1919; GABRIEL 1928; WALTON & MARTIN 1979]

Clostridien sind sporenbildende, stäbchenförmige, obligat anaerobe, gram-positive Bakterien. Sie gehören zur Klasse der Clostridia und sind ubiquitär, vor allem aber in Böden und Verdauungstrakten zu finden. Zu den Clostridien, die Butanol als Hauptprodukt bilden, gehören *Clostridium acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. saccharobutylicum* und *C. saccharoperbutylacetonicum* (*C. spba.*). *C. acetobutylicum* und *C. beijerinckii* zählen zu den am besten untersuchten Stämmen. [KEIS ET AL. 2001; DÜRRE 2005]

Nach dem Krieg hatte die expandierende Automobilindustrie einen steigenden Bedarf an schnell trocknenden Lacken. Es stellte sich heraus, dass Butanol und dessen Ester ideale Lösungsmittel für die neu entwickelten Nitrocellulose-Lacke waren, was zu einem erhöhten Bedarf an Butanol führte [KILLEFFER 1927; GABRIEL & CRAWFORD 1930]. 1920 wurde deshalb die Lösungsmittelproduktion unter einer U.S. Lizenz (Patent 1,315,585; 1919) wieder aufgenommen [WEIZMANN 1919; GABRIEL 1928]. Einhergehend mit Verbesserungen bezüglich Phageninfektion, Substratnutzung, Nebenprodukt-nutzung sowie kontinuierlicher Fermentations- und Destillationsmethoden produzierten Anlagen, vorrangig aus Melasse, hauptsächlich in den USA, Kanada und

England [GABRIEL 1928; JONES & WOODS 1986]. Nach 1936 entstanden auch Anlagen in Japan, Indien, Australien und Südafrika, der ehemaligen Sowjetunion, China und Taiwan [ROSE 1961; SPIVEY 1978; HERRERO 1983]. Durch die stärker werdende Konkurrenz der petrochemischen Industrie und die verstärkte Verfütterung von Melasse an Rinder ging die Produktion von Butanol und Aceton ab den 1950er Jahren in den USA und England stark zurück und kam dort 1960 praktisch zum Erliegen [ROSE 1961; GIBBS 1983]. Durch die günstige Versorgung mit Kohle und Melasse sowie einer fehlenden konkurrenzfähigen Erdölversorgung konnte die Aceton-Butanol-Fermentation in Südafrika bis Anfang der 1980er Jahre ökonomisch Lösungsmittel produzieren. Substratengpässe und weitere Fermentations- und Kostenprobleme zwangen jedoch die Betreiber 1983 zu einer Schließung der Anlage [JONES & WOODS 1986]. In der ehemaligen Sowjetunion wurde der Prozess bis in die 1980er Jahre weiter entwickelt, wobei im industriellen Maßstab lignocellulosehaltige Agrar-Reststoffe eingesetzt wurden [ZVERLOV ET AL. 2006]. In China wurden Anlagen mit einer durchschnittlichen Jahresproduktion von 350 000 t bis 2004 betrieben [CHIAO & SUN 2007]. 2006 nahmen einige Anlagen in China die Produktion wieder auf, wovon zehn Anlagen eine ABE-Gesamtproduktion von 210 000 t pro Jahr erreichten [NI & SUN 2009].

1.3 Marktsituation

2011 belief sich der Bedarf an Butanol als Chemikalie auf etwa 3 Mio. t pro Jahr mit einem Marktvolumen von 5 Mrd. \$ [GREEN 2011; COBALT-TECHNOLOGIES 2012]. 2012 schätzte man den Bedarf an Butanol auf etwa 4,5 Mio. t pro Jahr und wurde mit rund 1,80 \$/kg gehandelt [9TH NOVEMBER 2012, OXO-ALCOHOLS (USA)]. Dies entspricht einem Marktvolumen von 8,1 Mrd. \$. Die USA exportierte 2013 213.000 t Butanol, welches vorwiegend chemisch über die Oxosynthese aus Propen gewonnen wurde [CERESANA 2014]. Knapp 1,5 Mio. t Butanol wurden im Jahr 2013 allein für die Herstellung von Butylacrylat eingesetzt, welches in wasserbasierten Farben, Reinigungsprodukten, Klebstoffen und Textilien eingesetzt wird. In den Industrieländern Westeuropas und Nordamerikas ist der Markt weitgehend gesättigt und soll bis 2021 nur noch um 0,4-0,5 % pro Jahr steigen. Weltweit stieg der jährliche Verbrauch von 2005 bis 2013 um 2,7 % [CERESANA 2014]. Aufgrund der spezifischen Lösungsmitelegeigenschaften sind Butanol und dessen Derivate bedeutende Chemikalien in Farben und Lacken. Butanol

dient nicht mehr so häufig als Lösungsmittel, sondern als Kopplungsmittel in wasserbasierten Formulierungen. Knapp 12 % werden direkt als Lösungsmittel eingesetzt. Zweitwichtigstes Einsatzgebiet ist Butylacetat in der Fahrzeuglackierung als Lösungsmittel und als Zusatz in Kosmetika und Medikamenten. Auf Butanol basierende Glycolether sind gut mit Wasser mischbar und eignen sich deshalb für Wasserlacke. In geringerem Anteil werden aus Butanol Phthalate als Weichmacher von PVC hergestellt. China ist mit Abstand führender Verbraucher von Butanol durch Bauwirtschaft, Holzverarbeitung und Fahrzeugindustrie. Chinas Butanolverbrauch wird 2021 voraussichtlich auf 1,64 Mio. t pro Jahr steigen. [CERESANA 2014]

1.4 Fermentationsprozess

Die ABE-Fermentation ist ein biphasischer Prozess, in dem zuerst in einer acidogenen Phase Säuren (Acetat und Butyrat) und Gase (H_2 und CO_2) gebildet werden, um danach in einer solventogenen Phase aus den Säuren die Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol zu bilden [KEIS ET AL. 2001]. An die Solventogenese ist üblicherweise auch die Sporulation der Zellen gekoppelt, was zu einem Abbruch der Fermentation führt [PAREDES ET AL. 2005]. Ganz charakteristisch für den Prozess ist der pH-Verlauf. Er sinkt zu Beginn der Fermentation durch die Säurebildung auf einen kritischen Wert ab, der, je nach Fermentationsstamm, bei pH 4,5-5 liegen kann und gleichzeitig ein Auslöser für das Umschalten in die solventogene Phase ist [KIM ET AL. 1984]. In der solventogenen Phase steigt der pH-Wert mit Bildung neutraler Lösungsmittel aus den aufgenommenen Säuren wieder an. Je nach Substrat-, Medien- und Prozessbedingungen ist eine Batch-Fermentation nach 2-6 Tagen abgeschlossen und erreicht meist Lösungsmittel-Endkonzentrationen von 12-20 g/L [LEE ET AL. 2008]. Die Produkte Aceton, Butanol und Ethanol treten typischerweise im Verhältnis von etwa 3:6:1 auf, können aber auch, je nach Stamm und Prozessbedingungen, variieren [JONES & WOODS 1986]. Butanol nimmt dabei den größten Teil der Produkte ein, gefolgt von Aceton und Ethanol [VAN DER WESTHUIZEN ET AL. 1982; EZEJI ET AL. 2004].

Ein Hauptproblem des Prozesses ist die toxische Wirkung des Hauptproduktes Butanol (siehe 1.7, Seite 19), weshalb bis heute in Batch-Fermentationen nur geringe Produkt-Endkonzentrationen (bis zu 21 g/L Butanol und 36 g/L Lösungsmittel) erreicht werden konnten [QURESHI & BLASCHEK 2001]. Zur Überwindung dieses Problems gibt es

verschiedene Ansätze wie Screening nach butanoltoleranten Stämmen, Metabolic-Engineering oder *in situ*-Produktabtrennung, auf die in Kapitel 1.9, Seite 22) noch näher eingegangen wird.

1.5 Fermentationsverfahren

Im Laufe der Jahrzehnte sind verschiedene Fermentationsmethoden wie Batch, Fed-Batch oder kontinuierliche Fermentation für den ABE-Prozess untersucht, eingesetzt und optimiert worden. Auch zweistufige Prozesse mit separaten Stämmen, die vorrangig Säuren oder Lösungsmittel bilden und nacheinander geschaltet werden oder Prozesse mit Mischkulturen sind entwickelt worden [RAMEY & YANG 2004; RICHTER ET AL. 2012].

In **Batch**-Versuchen, als einfachste Fermentationsvariante, wurden viele Parameter getestet, um den Prozess zu verstehen, zu optimieren und die Produkt-Endkonzentration zu steigern. Zu wichtigen Prozessparameter zählen Fermentationsstamm, pH-Wert, C/N-Verhältnis, CO₂- und H₂-Partialdruck, Durchmischung, Temperatur, Substratart (Säuren, Zucker, Rohsubstrate, Hydrolysate) oder Substratkonzentration.

Im **Fed-Batch** können zu hohe und damit hemmende Anfangskonzentrationen der Substrate und Co-Substrate umgangen werden, indem die jeweiligen Stoffe nach Bedarf zugeführt werden. Häufig können Zuckerkonzentrationen von 50-60 g/L verwertet werden. Eine Hemmung kann auch durch Katabolitrepression auftreten, wodurch die Nutzung weniger bevorzugter Substrate (z.B. Xylose) durch die Präsenz bevorzugter Substrate (z.B. Glucose) gehemmt wird [FOND ET AL. 1986]. Die Synthese von Enzymen zur Nutzung anderer Substrate wird dadurch unterdrückt. Es entstehen längere Lag-Phasen und damit auch schlechtere Produktivitäten [SHINTO ET AL. 2008]. Die positive Wirkung der kontrollierten Zugabe von Säuren (Butyrat) als Co-Substrat konnte in einem Fed-Batch-Versuch mit pH-Wert-Kontrolle ermittelt werden [RAMEY & YANG 2004; TASHIRO ET AL. 2004].

Eine **kontinuierliche** Fermentation erlaubt eine gute Steuerung des Prozesses. Die Fermentation kann z.B. in einer Phase (acidogen/solventogen) gehalten werden. Durch eine hohe Verdünnungsrate bleibt die Kultur in der acidogenen Phase. Eine geringere

Verdünnungsrate stimuliert den Wechsel in die solventogene Phase [MUTSCHLECHNER ET AL. 2000]. Bei kontinuierlichen Verfahren mit freien Zellen würden Verdünnungsraten von über 0,25-0,3/h ein Auswaschen der Zellen verursachen, was eine geringe Zelldichte und damit eine geringere Produktivität zur Folge hat [TASHIRO ET AL. 2005]. Der Auswaschung von Zellen kann z.B. mit einer Zellimmobilisierung entgegengewirkt werden.

Für die Immobilisierung von Clostridien, vorrangig in kontinuierlichen Prozessen, wurden eine Reihe von Trägermaterialien getestet [TASHIRO ET AL. 2013]. Darunter zählen z.B. Schwämme [PARK ET AL. 1989], Knochenkohle [QURESHI ET AL. 1988; FRIEDL ET AL. 1991], Ziegelsteine [YEN ET AL. 2011], Steinkohle [WELSH ET AL. 1987], Calcium-Alginat [LARGIER ET AL. 1985] und Keramikkügelchen [BADR ET AL. 2001] sowie verschiedene Fasermaterialien [HUANG ET AL. 2004]. Viele der oben genannten Trägermaterialien zielen auf eine oberflächliche Adsorption der Zellen am jeweiligen Material ab. Mit Calcium-Alginat oder k-Carrageen wird eine Einschlussimmobilisierung in Kügelchen oder Pellets erreicht [FRICK & SCHUGERL 1985; LARGIER ET AL. 1985; SCHOUTENS ET AL. 1985]. Dabei darf aber auch der Stoffaustausch zwischen Zellen und Medium nicht behindert werden. Eine Weiterentwicklung der Einschlussimmobilisierung sind LentiKats® [JAHNZ 2000; VORLOP & JEKEL 2000]. Die Zellen werden dabei in eine linsenförmige Gel-Matrix aus Polyvinylalkohol (PVA) eingeschlossen. Diese verfügen, im Vergleich zu Kugeln, durch ihre konkave Form über eine größere Oberfläche und gewährleistet einen verbesserten Stoffaustausch [JEKEL ET AL. 1998].

1.6 Stoffwechselweg

Abbildung 1.6.1 zeigt ein Schema des biphasischen Stoffwechsels solventogener Clostridien. In der Glycolyse wird Glucose unter Bildung von ATP und $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu Pyruvat umgewandelt. Aus Pyruvat entsteht, durch Abspaltung von CO_2 und Reduktion von Ferredoxin ($\text{Fd}_{\text{ox/re}}$), Acetyl-CoA und $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ oder auch H_2 . Ferredoxin übernimmt dabei die Funktion des Elektronen-Akzeptors und -Donators [KIM ET AL. 1988]. Hier beginnt der, für solventogene Clostridien typische, biphasische Teil des Stoffwechsels, der in säure- (acidogene) und lösungsmittelbildende (solventogene) Phasen unterteilt wird.

Einleitung

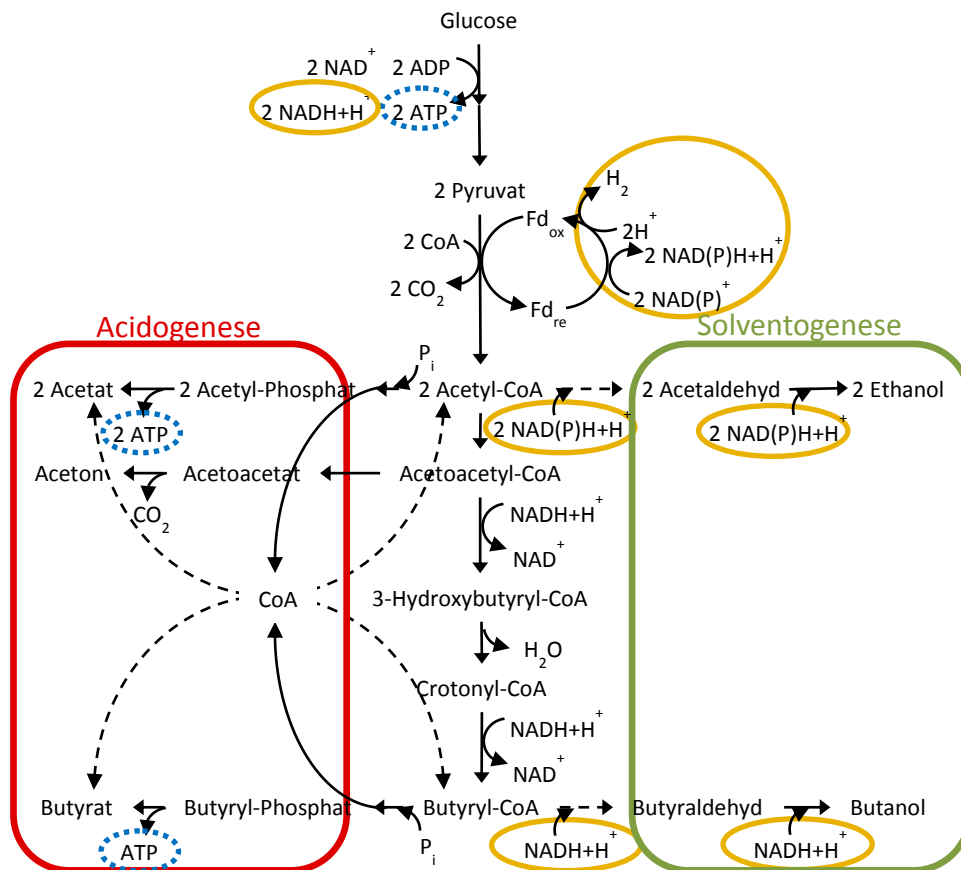


Abbildung 1.6.1: Metabolismus solventogener Clostridien, Säurebildungsphase (rot) Lösungsmittelbildungsphase (grün), Energiegewinnung in Form von ATP (blau, gepunktet), Elektronen-Transportvorgänge (gelb), verändert nach YU ET AL. 2011 und GARCIA ET AL. 2011

In der acidogenen Phase werden die Säuren Acetat und Butyrat gebildet, woraus die Zelle Energie in Form von ATP gewinnt und der pH-Wert absinkt. Durch einen aktiven Protonentransportprozess, über eine membrangebundene ATPase, ist der interne pH-Wert höher als der Externe [BOOTH & MORRIS 1975; HERRERO 1983; MONOT ET AL. 1984]. Bei zu niedrigem pH-Wert muss die Zelle vermehrt Energie in Form von ATP aufwenden, um den Protonengradienten zwischen Zelle und Medium über Protonenpumpen (ATPase) aufrecht zu erhalten [RIEBELING ET AL. 1975]. Einer übermäßigen Säureakkumulation und der einhergehenden pH-Wert-Senkung wird entgegengewirkt, indem die gebildeten Säuren wieder aufgenommen und zu neutralen Alkoholen reduziert werden [HARTMANIS ET AL. 1984]. Als Auslöser für das Umschalten in die solventogene Phase werden das Erreichen eines kritischen pH-Wertes (4,5-5) und eine geringe ATP-Konzentration in der Zelle angenommen [GRUPE & GOTTSCHALK 1992]. Die Säuren werden erst zu Acetyl- oder Butyryl-CoA umgewandelt, bevor unter

Verwendung von $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ die Alkohole Ethanol und Butanol gebildet werden. Wurden bei Erreichen des kritischen pH-Wertes nicht genügend Säuren gebildet, fällt die solventogene Phase nur sehr schwach aus und der Prozess kommt frühzeitig zum Erliegen. Eine Steigerung der Pufferkapazität kann dem entgegen wirken, wodurch Wachstum, Substratnutzung und Butanolproduktion gesteigert werden [BRYANT & BLASCHEK 1988]. Aceton entsteht aus Acetoacetyl-CoA unter Abspaltung von Coenzym-A (CoA) und CO_2 . Das abgespaltene CoA wird dabei für die Synthese von Acetyl- und Butyryl-CoA aus Acetat und Butyrat genutzt [MADIGAN ET AL. 2003a].

Nach WOOD ET AL. [1945] gehen etwa 55 % des Acetats und 85 % des Butyrats in die Butanolbildung ein, wogegen nur 15 % Acetat und 2 % Butyrat der Acetonbildung zugeführt werden. Die in diesem Prozess gebildeten Gase H_2 und CO_2 entstehen bei der Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und bei der Bildung von Aceton.

Für *C. acetobutylicum* und *C. beijerinckii* wurde eine Degeneration beschrieben, bei der die Zellen während der Fermentation ihre Fähigkeit verlieren Lösungsmittel zu bilden [LEE ET AL. 2008]. Schon bei diesen beiden Stämmen gibt es dafür unterschiedliche Ursachen. In *C. acetobutylicum* verliert die Zelle den Megaplasmid *pSol1*, auf dem die Information für die Solventogenese verschlüsselt ist. Der Verlust kann unter phosphatlimitierten Bedingungen verhindert werden [EZEJI & BLASCHEK 2005]. Für *C. beijerinckii*, der einen solchen Plasmid nicht besitzt, kann eine dennoch auftretende Degeneration durch Zugabe von Natrium-Acetat unterbunden und die Lösungsmittelbildung beibehalten werden [KASHKET & CAO 1993; CHEN & BLASCHEK 1999a]. Ein Überschuss der C-Quelle und unter N-Limitierung führt bei *C. acetobutylicum* zu einer erhöhten Lösungsmittelproduktion [MADIHAH ET AL. 2001].

1.6.1 Bedeutung der Reduktionsäquivalente

Acetyl-CoA wird aus der Oxidation (Abspaltung von H) von Pyruvat gebildet. Die aus dem e^- -Donor abgespaltenen Elektronen müssen beseitigt werden. Daraus können entweder reduzierte Endprodukte, wie Ethanol und Butanol gebildet werden oder mit Hilfe von Ferredoxin, Hydrogenase und H^+ elementarer H_2 entstehen [MADIGAN ET AL. 2003a]. Die Bildung von H_2 ist jedoch energetisch ungünstig und dient hauptsächlich der Erhaltung des Redox-Gleichgewichtes. Wird die H_2 -Bildung verhindert, wird das

Redox-Gleichgewicht zu reduzierteren Produkten hin verschoben (von Säuren zu Alkoholen) [MADIGAN ET AL. 2003a].

Tritt ein Mangel an Reduktionsäquivalenten auf, können die Säuren nicht mehr zu neutralen Alkoholen reduziert werden, was den pH-Wert auf einem niedrigen Niveau hält, wodurch die ATPasen weiterhin ATP verbrauchen, um den Protonengradienten aufrecht zu erhalten. Die ATP-Konzentration sinkt und in Folge dessen können überlebensnotwendige, energiebedürftige Prozesse, wie die Phosphorylierung von Glucose zu Fructose-1,6-bisphosphat nicht mehr ablaufen.

Der theoretisch maximale Ertrag

Die genaue Bestimmung des theoretischen Ertrags wurde kontrovers diskutiert und ist aufgrund der vielen Variationen in den beiden Stoffwechselphasen Acidogenese und Solventogenese (Säuren/Lösungsmittel; H₂/reduzierte Endprodukte; Biomasse/Endprodukte) nicht möglich [YERUSHALMI ET AL. 1983; HAGGSTROM 1985]. Durch Annahme einer unveränderten Biomasse und gleichbleibender Lösungsmittel-Bildungsrate konnte für *C. acetobutylicum* ein theoretischer maximaler Ertrag von 0,39 gLösungsmittel/gSubstrat errechnet werden [YERUSHALMI ET AL. 1983; HAGGSTROM 1985; JONES & WOODS 1986].

1.7 Toxizität - Einfluss von Butanol auf Zellen

Im ABE-Prozess weist das Lösungsmittel Butanol die höchste Toxizität auf und wird zudem in der höchsten Konzentration gebildet. Aceton und Ethanol hemmen dagegen das Wachstum erst bei einer Konzentration von 40 g/L um 50 % [JONES & WOODS 1986].

Butanol kann, als organisches, unpolares und lipophiles Lösungsmittel, sehr gut in den lipophilen Teil der Membran eindringen und dort akkumulieren (Abbildung 1.7.1) [DE BONT 1998; RUHL ET AL. 2009]. Untersuchungen an verschiedenen Mikroorganismen ergaben, dass Lösungsmittel wie Butanol die Membraneigenschaften verändern, indem sie die Fluidität erhöhen [DE BONT 1998; KANNO ET AL. 2013]. 1 % Butanol (v/v) führt bereits zu einer Erhöhung der Membranfluidität um 20-30 % [VOLLHERBST-SCHNECK ET AL. 1984]. Zudem wird die Aktivität der membrangebundenen ATPase gehemmt, wie für *C. acetobutylicum* gezeigt werden konnte [MOREIRA ET AL. 1981; BOWLES & ELLEFSON 1985]. Im Gegenzug bildeten die Zellen mehr gesättigte Fettsäureketten in der

Einleitung

Membran und reduzieren die Ungesättigten, um die Stabilität der Membran aufrecht zu erhalten [VOLLHERBST-SCHNECK ET AL. 1984; DE BONT 1998; KANNO ET AL. 2013].

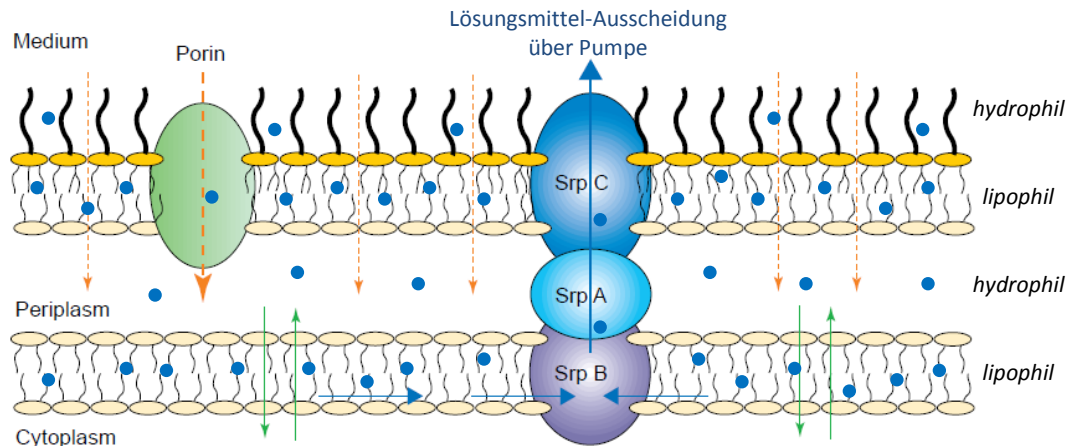


Abbildung 1.7.1: Verhalten und Transport von unpolaren, lipophilen Lösungsmitteln • an einer Phospholipid-Membran am Beispiel von *Pseudomonas putida*, Pfeile zeigen mögliche Bewegungsrichtungen des Lösungsmittels in, an und durch die Membran bzw. Membranproteine an; verändert nach DE BONT 1998 und RÜHL ET AL. 2009

Die Phosphotransferase-Aktivität in *C. acetobutylicum*, welche für die Phosphorylierung der Glucose verantwortlich ist, wurde durch Zugabe von bis zu 2 % Butanol nicht beeinflusst [HUTKINS & KASHKET 1986]. Butanol zerstört aber die Funktionalität der Membran mit den darin eingebetteten Membranproteinen und hemmt zudem die Aufnahmefähigkeit von Substraten wie Glucose [BOWLES & ELLEFSON 1985]. Bei *C. acetobutylicum* zeigte sich der Effekt von Lösungsmitteln auf Xylose als Substrat im Vergleich zu Glucose sogar verstärkt [OUNINE ET AL. 1985]. Die Temperatur spielt bei der Toxizität von Butanol ebenfalls eine Rolle. Die Toxizität sinkt mit der Temperatur, wobei sich allerdings auch das Zellwachstum reduziert [KNOSHAUG & ZHANG 2009]. Eine Erklärung hierfür könnte die temperaturabhängige Fluidität von Membranen sein, die sich mit sinkender Temperatur verringert. Die Zellen wirken hier mit einer vermehrten Bildung ungesättigter Fettsäureketten entgegen, um die optimale Membranfluidität aufrecht zu erhalten [DE BONT 1998].

In Tabelle 1.7.1 sind verschiedene, zum Teil adaptierte und gentechnisch veränderte Organismen und deren Toleranzen gegenüber Butanol dargestellt. Damit zeigt sich, dass die Toxizität von Butanol ein schwer zu lösendes Problem darstellt.

Einleitung

Tabelle 1.7.1: Butanoltoleranzen einiger Organismen

| Organismus | Toleranz [% (Wt/V)] | Quelle |
|---------------------------------------|------------------------|--|
| <i>Bacillus subtilis</i> | 1,3 | [NIELSEN ET AL. 2009] |
| <i>Clostridium acetobutylicum</i> G1 | 1,8 | [SOUCAILLE ET AL. 1987] |
| <i>Clostridium beijerinckii</i> BA101 | 2 | [LEE ET AL. 2008] |
| <i>Escherichia coli</i> L33 | 1,3 | [KLEIN-MARCUSCHAMER ET AL. 2009] |
| <i>Lactobacillus brevis</i> | 2,4 | [KNOSHAUG & ZHANG 2009] |
| <i>Lactobacillus delbrückii</i> | 2,4 | [KNOSHAUG & ZHANG 2009] |
| <i>Pseudomonas putida</i> DOT-T1E | 4,9 | [RUHL ET AL. 2009] |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ESY7 | 1,6 | [STEEN ET AL. 2008; KNOSHAUG & ZHANG 2009] |

1.8 Chancen und Herausforderungen des ABE-Prozesses

Solventogene Clostridien haben ein breites Substratspektrum (Mono-, Di- und Polysaccharide) und scheiden verschiedenste Enzyme aus (Amylase, Glucosidase, Glucoamylase, Pullulanase, Amylopullulanase), um komplexere Polysaccharide aufzuspalten [EZEJI ET AL. 2007; KUMAR & GAYEN 2011]. Sie sind robuste Organismen und können nur unter anoxischen Bedingungen leben, was gut als selektives Merkmal genutzt werden kann, um z.B. Kontaminationen mit aeroben Organismen zu verhindern. Der Prozess kann heute jedoch nicht ökonomisch betrieben werden, da er, durch die geringe Effektivität, einiger Verbesserungen bedarf.

Die Substratkosten sind mit den heute zum Großteil verwendeten C-Quellen auf Zucker- oder Stärkebasis zu hoch. Hinzu kommt die Konkurrenz zu Nahrungsmitteln. Es wäre wünschenswert, wenn z.B. Substrate wie Agrarreststoffe eingesetzt werden. Dieses Problem teilen aber die meisten biotechnischen Prozesse auf Basis zuckerhaltiger Substrate. Die Toxizität von Butanol stellt hingegen die größte Herausforderung dar und wirkt sich auf Produktkonzentration, Ertrag, Produktivität und letzten Endes auf die Produktaufarbeitung aus. Deren Energie- und Kostenaufwand sind bei der geringen Butanolkonzentration zu hoch. [QURESHI & BLASCHEK 2001; TASHIRO & SONOMOTO 2010; TASHIRO ET AL. 2013]

1.9 Lösungsansätze für einen effizienteren ABE-Prozess

1.9.1 Screening nach butanoltoleranten Stämmen

Mit dem Screening nach butanoltoleranten Stämmen könnten Organismen gefunden werden die zwar bei höheren Butanolkonzentrationen überleben, aber häufig nicht die Eigenschaft zeigen mehr Butanol zu produzieren [RUHL ET AL. 2009]. Tolerante Stämme könnten dann als Wirtszelle dienen, in die mit Hilfe gentechnischer Methoden die Fähigkeit zur Butanolproduktion eingebracht werden kann.

1.9.2 Metabolic Engineering

Aktuell gibt es noch wenig verfügbare Manipulationstools (ClosTron, TargeTron), um Clostridien-Stämme gentechnisch zu verändern und zu optimieren [HEAP ET AL. 2010; WANG ET AL. 2013]. Eine geringere Wachstumsrate oder der obligat anaerobe Stoffwechsel solventogener Clostridien machen eine gezielte Veränderung des Genoms, verglichen mit Modellorganismen wie *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) oder *Escherichia coli* (*E. coli*), zusätzlich schwieriger. Einige Arbeiten, die gut charakterisierte Modellorganismen wie *E. coli* oder *S. cerevisiae* nutzten, erzielten jedoch noch keine vergleichbaren Butanolkonzentrationen obwohl *E. coli* bis zu 1,5 % (v/v) Butanol tolerieren kann [ATSUMI & LIAO 2008a; ATSUMI & LIAO 2008b]. Durch die Entschlüsselung des Genoms von *C. acetobutylicum* [NOLLING ET AL. 2001], *C. beijerinckii* [WU ET AL. 2012] und *C. saccharoperbutylacetonicum* [DEL CERRO ET AL. 2014] sind weitere Grundlagen für die Entwicklung gentechnischer Methoden an Clostridien geschaffen worden.

1.9.3 Umgehen der Produkttoxizität durch Produktabtrennung

In den früheren ABE-Produktionsanlagen mit Batch-Prozessen wurde **Destillation** nach Abschluss der Fermentation als Produkt-Abtrennungsverfahren genutzt. Destillation ist bei den geringen Butanolkonzentrationen viel zu energieaufwändig. Dazu kommt die Azeotropbildung von Butanol und Wasser (55% und 45%) wodurch der Siedepunkt von 118 °C für Butanol auf 93°C für das Butanol/H₂O-Azeotrop sinkt [RAMEY & YANG 2004]. Angestrebt wird eine *in situ*-Abtrennung der Lösungsmittel, um die Toxizität von Butanol in der Kultur zu umgehen.

Zu einem weiteren häufig verwendeten und günstigen Abtrennungsverfahren zählt **Gas-Stripping**, welches auch *in situ* durch Umwälzen der Gasphase und Durchleiten feiner Gasblasen durch den Reaktor zu einem Mitreißen von Butanol und H_2O führt. Hierbei entsteht ebenfalls ein Lösungsmittel/ H_2O -Gemisch, das nach Kondensation nachträglich aufbereitet werden muss. [QURESHI & MADDOX 1991; QURESHI ET AL. 1992; VANE 2008]

Unter den **Membranverfahren** sind vorrangig die Pervaporation oder die Perstraktion zur Abtrennung von organischen Lösungsmitteln aus wässrigen Medien zu nennen. Bei der Pervaporation wird über einer speziellen semipermeablen Membran ein Unterdruck bzw. Vakuum oder ein Inertgas-Strom angelegt, um einen Konzentrationsgradienten zu erzeugen. Dabei gehen vorrangig die Lösungsmittel aus dem wässrigen Medium (Retentat) durch die, in diesem Fall hydrophobe Membran als Dampf (Permeat) auf die Permeat-Seite über. Das Permeat kann im Anschluss abkondensiert werden [AHLERS 2003; VANE 2005]. Die Perstraktion ist eine membranunterstützte Extraktion [MATSUMURA & MÄRKL 1986]. Hier wird statt eines Unterdruckes oder Inertgases ein geeignetes Extraktionsmittel über eine Membran geleitet, welches die Lösungsmittel aufnehmen kann. Die Lösungsmittel können nachfolgend aus dem Extraktionsmittel destilliert werden [AHLERS 2003].

Bei der **Flüssig/Flüssig-Extraktion** wird die Fermentationsbrühe mit einem nicht toxischen und in H_2O unlöslichen Extraktionsmittel gemischt oder überschichtet. Butanol sollte dabei deutlich stärker im organischen Extraktionsmittel löslich sein als in der wässrigen Phase und geht deshalb aus dieser in die organische Phase über, wo es akkumulieren kann [EZEJI ET AL. 2007]. Die Lösungsmittel können aus dem Extraktionsmittel durch Destillation gewonnen werden [MADDOX 1989]. Der Siedepunkt des Extraktionsmittels sollte über dem des Butanols liegen. Weitere Kriterien für ein geeignetes Extraktionsmittel sind ein flüssiger Aggregatzustand bei Raumtemperatur und eine schnelle Phasentrennung des Extraktionsmittel-Wasser-Gemisches.

1.10 Aktuelle Beispiele industrieller Aktivitäten zur fermentativen Butanol-Herstellung

MetabolicExplorer (FR) hat, nach eigenen Angaben, einen flexiblen und konkurrenzfähigen Prozess entwickelt, der durch Fermentation von Stärke, Zucker, Zuckerrohrsaft, Melasse oder Hemicellulose Butanol produziert. Nach dem Jahresbericht von 2012 hat die Firma ihre Aktivitäten zur Herstellung von Butanol vorerst eingestellt und sucht einen Partner zur Finanzierung [METABOLICEXPLORER 2012].

Gevo (USA) nutzt Hefen, die durch Stoffwechselveränderungen Iso-Butanol statt Ethanol bilden können. Fermentiert wird in einer umgerüsteten Ethanol-Anlage in Minnesota [EVANKO ET AL. 2009; GREEN 2011; GEVO 2014].

Butalco GmbH (CH) kann mit gentechnisch veränderten Hefen (*Saccharomyces cerevisiae* mit Genen aus *Clostridium phytofermentans*) Iso-Butanol (0,6 g/L) aus lignocellulose-haltigen Substraten herstellen [BUTALCO-GMBH 2013].

GreenBiologics Ltd. (UK/USA) nutzt „verbesserte“ Produktionsstämme (Clostridien), die zucker-, stärke- und lignozellulosehaltige Biomasse verwerten können [GREEN-BIOLOGICS 2014].

Cobalt Technologies (USA) verwendet einen speziellen Aufschluss lignozellulosehaltiger Biomasse unter milden Bedingungen, und nutzt gescreente Bakterien in einem optimierten Fermentationsprozess. Die Produkte werden durch eine verbesserte Destillation aufgearbeitet [COBALT-TECHNOLOGIES 2012].

Butamax™ (DuPont/BP) (USA/UK) ist ein Zusammenschluss aus BP und DuPont mit umgerüsteten Ethanol-Anlagen in den USA und einer Demonstrationsanlage in UK. Iso-Butanol, hergestellt mit rekombinanten Mikroorganismen, wird mit Oleylalkohol extrahiert bzw. über Gasstripping abgetrennt [NICOLAOU ET AL. 2010; GREEN 2011; BUTAMAX™ 2014].

SyntecBiofuel Inc. (CA) nutzt Biomasse die zu Synthese-Gas umgewandelt und in einem Festbettreaktor fermentiert wird. Die gebildeten Produkte Methanol, Ethanol, n-Propanol, und Butanol werden destillativ abgetrennt [SYNTECBIOFUEL 2008].

Cathay Industrial Biotech (CN) betreibt eine Anlage in Jilin. Die Butanolherstellung erfolgt über anaerobe Fermentation von Mais oder anderer Biomasse [CATHAY-INDUSTRIAL-BIOTECH-LTD. 2012].

1.11 Zielsetzung der Arbeit

Die ABE-Fermentation ist heute, aufgrund der geringen Effizienz des Prozesses, nicht ökonomisch durchführbar. Hohe Rohstoffkosten, die Toxizität von Butanol und die daraus resultierenden geringen Produktkonzentrationen, was wiederum eine aufwändige Produktabtrennung nach sich zieht, stellen die größten Herausforderungen dar.

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Etablierung eines biotechnischen Prozesses, in dem Butanol aus agrarischen Rest- oder Rohstoffen produziert werden kann. Zur Senkung der Kosten des Prozesses sollten zunächst komplexe Medienbestandteile reduziert werden. Auf Basis des reduzierten Mediums dienten weitere Versuche der Aufklärung des Fermentationsverlaufs und seiner Einflussfaktoren für eine spätere Prozessoptimierung mit dem Substrat Glucose. Für eine zusätzliche Prozesskostensenkung wurden Agrarrohstoffe wie Zuckerrübe und lignozellulosehaltiges Material sowie dessen Hydrolysat als Substrat eingesetzt. Die Stabilisierung des Prozessverlaufs durch immobilisierte Zellen wurde ebenfalls über einen Zeitraum von mehr als 1000 Stunden getestet. Um höhere Produktmengen erhalten zu können ist eine *in situ*-Abtrennung des toxischen Hauptproduktes Butanol essentiell. Für die gewählte Methode der Flüssig-Flüssig-Extraktion wurden verschiedene Extraktionsmittel auf ihre Eignung, bezüglich Verteilungskoeffizient sowie Toxizität getestet. Abschließend wurde ein geeignetes Extraktionsmittel in einer Fermentation eingesetzt.

2 Material und Methoden

2.1 Arbeiten unter anoxischen Bedingungen

Angesichts der strikt anaeroben Lebensweise der verwendeten solventogenen Clostridien fanden alle Inkubationsexperimente unter aseptischen und anoxischen Bedingungen statt. Dazu wurden alle verwendeten Geräte bei 121 °C für 15 min autoklaviert bzw. steril verpacktes Material verwendet und in eine Anaerobier-Bank (A-Bank), (Shellab Bactron IV 2, Sheldon manufacturing INC., Cornelius, US) eingeschleust. Alle Lösungen wurden in gasdicht verschließbaren Schraubglasflaschen (SIMAX, Kavalierglass, Sázava, CZ; SCHOTT DURAN, Mainz, DE) mit Reinstwasser angesetzt und leicht geöffnet autoklaviert, warm (≤ 80 °C) entnommen und ebenfalls in die A-Bank eingeschleust. Hitzelabile Lösungen wie die L-Cystein-Hydrochloridlösung oder FeSO_4 -Lösung wurden in der A-Bank mit sterilen 0,22 μm Rotilabo® CME-Spritzenfiltern (Roth, Karlsruhe, DE) filtriert. Die Bestandteile Ammoniumacetat, Redoxindikator sowie, falls erforderlich, Hefeextrakt und Trypton wurden zusammen als zweifach konzentrierte Stammlösung angesetzt, autoklaviert und in die A-Bank eingeschleust. Hier konnten alle Stammlösungen unter O_2 -freier Atmosphäre zum fertigen Medium zusammengestellt und in die jeweiligen sterilen Inkubationsgefäße überführt werden. Durch die Verwendung getrennt sterilisierter Stammlösungen konnte ein Ausfallen bestimmter Medienbestandteile, wie es beim gemeinsamen Autoklavieren der Fall wäre, verhindert werden. Die Probenahme und Zugabe von Lösungen aus und in Vials, Schraubglasflaschen oder Reaktoren erfolgte außerhalb der A-Bank mit sterilen N_2 -gespülten Spritzen und Kanülen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE).

2.1.1 Redoxindikator

Als Redoxindikator diente eine 1 %ige Resazurinlösung. Resazurin wird durch Reduktion irreversibel zu rosafarbenem Resorufin umgesetzt und in einer zweiten reversiblen Reaktion zu farblosem Dihydroresorufin reduziert (Abbildung 2.1.1) [TWIGG 1945]. Die Entfärbung des Mediums zeigt reduzierte und damit anoxische Bedingungen an.

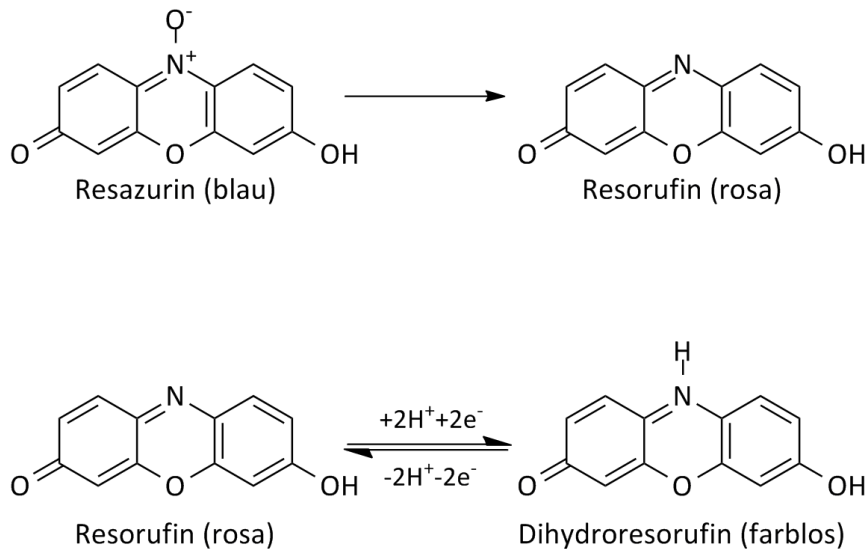


Abbildung 2.1.1: Reaktion des blauen Redoxindikators Resazurin zu farblosem Dihydroresorufin

2.1.2 Reduktionsmittel

Zur Herstellung einer 5 %igen L-Cysteinlösung sind 50 g/L L-Cystein-Hydrochlorid · H₂O in Reinstwasser gelöst und auf 40 °C erwärmt worden. Nach sofortigem Einschleusen in die A-Bank wurde die noch warme Lösung unter anoxischen Bedingungen in eine sterile Schraubglasflasche steril filtriert, verschlossen und lichtgeschützt bei Raumtemperatur in der A-Bank aufbewahrt. Um die Lösung auch außerhalb der A-Bank nutzen zu können, wurde sie in 20-mL-Vials (Machery Nagel, Düren, DE) überführt, mit einem passenden Butylgummistopfen und Alukappen (Machery Nagel, Düren, DE) gasdicht verschlossen und ausgeschleust. Die Entnahme und nachträgliche Einbringung in Reaktoren erfolgte mit N₂-gespülten Einwegspritzen und -kanülen (Inject®Solo, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE). L-Cystein-Hydrochlorid diente als Reduktionsmittel, welches als letztes in das noch warme Medium gegeben wurde. Durch Oxidation von L-Cystein mit Rest-O₂ wird unter Abspaltung von H₂O und Ausbildung von Disulfidbrücken L-Cystin gebildet (Abbildung 2.1.2).

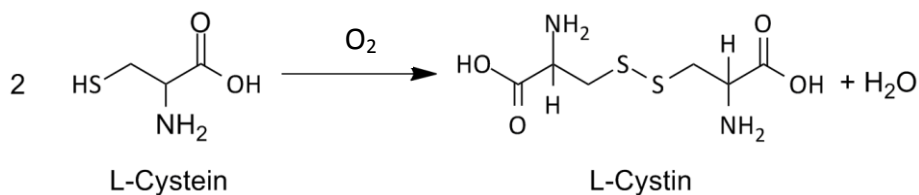


Abbildung 2.1.2: Reaktion des als Reduktionsmittel verwendeten L-Cystein zu L-Cystin durch Ausbildung von Disulfidbrücken

Material und Methoden

Mit passenden Butylgummistopfen oder Schraubverschlüssen (SCHOTT DURAN, Mainz, DE) gasdicht verschlossene, anoxische und sterile Ansätze in Vials, Schraubglasflaschen oder Reaktoren (Ochs, Bovenden/Lengler, DE bzw. W.O. Schmidt, Braunschweig, DE) konnten nun ausgeschleust und bei Raumtemperatur gelagert oder direkt mit Vorkultur beimpft und inkubiert werden.

Um eine Anreicherung von Ethanol in der A-Bank zu verhindern, wurde zur Oberflächendesinfektion innerhalb der A-Bank Barrycidal®³⁶ (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, DE) verwendet. Außerhalb der A-Bank kamen zur Oberflächendesinfektion eine 70 %ige Ethanollösung und das Abflammen von Septen zum Einsatz.

Die Zugabe steriler und anoxischer Lösungen sowie die Beprobung an laufenden Inkubationsversuchen erfolgte mit N₂-gespülten, sterilen Einwegspritzen und -kanülen, wenn möglich, in einer Sterilwerkbank (HeraSafe HS 18/2, Heraeus Instruments, Hanau, DE). Zuvor wurde die Oberfläche der jeweiligen Butylgummistopfen, wie oben beschrieben, sterilisiert.

Um Lösungen außerhalb der A-Bank nachträglich O₂ zu entziehen, konnte eine Anaerobisierungsanlage nach NEUMANN [1993] (Abbildung 2.1.3) genutzt werden. Damit konnten, durch intervallartiges Anlegen eines Vakuums und nachfolgendes Spülen mit N₂, anoxische Bedingungen in gasdichten Gefäßen erreicht werden. Als Zugang dienten auch hier sterile Einwegkanülen mit 0,22 µm Rotilabo CME-Spritzenfilter, um Kontaminationen durch das Gas zu verhindern.

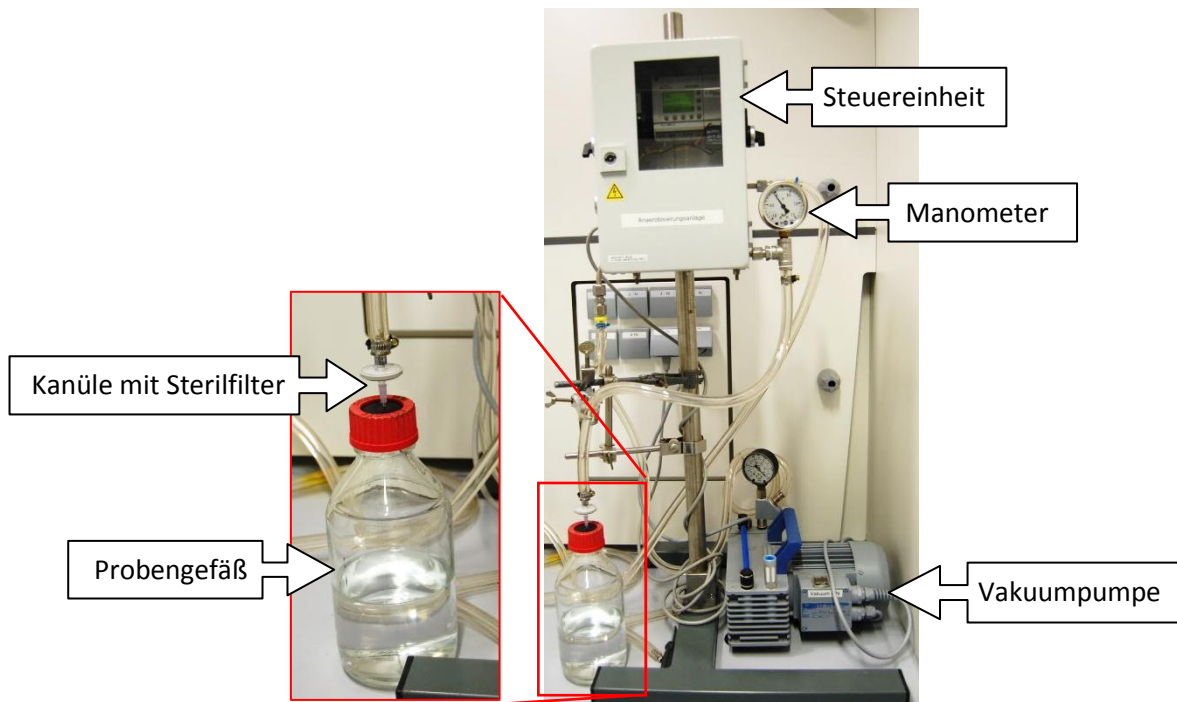


Abbildung 2.1.3: Anaerobisierungsanlage nach NEUMANN [1993] mit angeschlossenem 1 L Probengefäß geschützt in einem Laborabzug

2.2 Fermentationsstamm

Soweit nicht anders beschrieben, erfolgten alle Inkubationsversuche mit dem gram-positiven, sporenbildenden Bakterium *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N 1-4 (DSM 14923) [KEIS ET AL. 2001], im Folgenden als *C. spba.* bezeichnet. Er wurde aus einem Lyophilisat der DSMZ nach Anleitung in RCM-Medium regeneriert und für die Stammhaltung als Kryokultur bei -80 °C oder später als Sporensuspension bei Raumtemperatur gelagert.

2.3 Medien

Die in Tabelle 2.3.1 dargestellten Medien wurden für erste Inkubationsversuche (TYA), Stammhaltung und Anzucht der anaeroben Clostridien (RCM/TYA) verwendet.

Tabelle 2.3.1: Komplexe Medien für Stammhaltung und Anzucht anaerober Clostridien

| RCM (Merck KGaA, Darmstadt, DE) | | TYA-Medium | |
|--|-------|--------------------------------------|-------|
| Substanz | [g/L] | Substanz | [g/L] |
| Fleischextrakt | 10 | Trypton | 6 |
| Pepton | 10 | Ammoniumacetat | 3 |
| Hefeextrakt | 3 | Hefeextrakt | 2 |
| D(+)-Glucose | 5 | KH ₂ PO ₄ | 0,5 |
| Stärke | 1 | MgSO ₄ | 0,3 |
| NaCl | 5 | FeSO ₄ 7 H ₂ O | 0,01 |
| Natriumacetat | 3 | Resazurin 1% | 1 mL |
| L-Cystein HCl | 0,5 | L-Cystein HCl | 0,28 |
| Agar-Agar | 0,5 | | |

Tabelle 2.3.2 zeigt Medienzusammensetzungen, wie sie für Fermentationen und weitere Inkubationsversuche verwendet wurden.

Tabelle 2.3.2: Reduzierte Varianten des komplexen TYA-Mediums für Fermentationen

| YA-Medium | | A-Medium | |
|---------------------------------------|-------|---------------------------------------|-------|
| Substanz | [g/L] | Substanz | [g/L] |
| Ammoniumacetat | 3 | Ammoniumacetat | 3 |
| Hefeextrakt | 2 | KH ₂ PO ₄ | 0,5 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,5 | MgSO ₄ | 0,3 |
| MgSO ₄ | 0,3 | FeSO ₄ *7 H ₂ O | 0,01 |
| FeSO ₄ *7 H ₂ O | 0,01 | Resazurin 1% | 1 mL |
| Resazurin 1% Lösung | 1 mL | L-Cystein HCl | 0,28 |
| L-Cystein HCl | 0,28 | Vitaminlösung (Tabelle 2.3.4) | 3 mL |
| | | Spurenelementlösung (Tabelle 2.3.4) | 1 mL |

Material und Methoden

Das Sporulationsmedium aus Tabelle 2.3.3 diene zur Herstellung von Sporen für die Stammhaltung. Dem gegenüber gestellt wurde das DSMZ-Medium 104b, mit dem keine Sporenbildung beobachtet werden konnte.

Tabelle 2.3.3: Sporeninduzierendes Medium und Medium der DSMZ, mit dem keine Sporulation beobachtet werden konnte.

| Sporulationsmedium | | DSMZ-Medium 104b, PYX-Medium | |
|---------------------------------------|-------|-------------------------------------|-------|
| Substanz | [g/L] | Substanz | [g/L] |
| Ammoniumacetat | 3 | Trypticase Pepton | 5 |
| KH ₂ PO ₄ | 0,5 | Pepton (Pepsinverdaut) | 5 |
| MgSO ₄ | 0,3 | Hefeextrakt | 10 |
| FeSO ₄ *7 H ₂ O | 0,01 | D-Glucose | 5 |
| Resazurin 1% Lösung | 1 mL | L-Cystein-HCl x H ₂ O | 0,5 |
| L-Cystein HCl | 0,28 | Resazurin 1% Lösung | 0,001 |
| Vitaminlösung (Tabelle 2.3.4) | 3 mL | Salzlösung 104b | 40 mL |
| Spurenelementlösung (Tabelle 2.3.4) | 1 mL | (Tabelle 2.3.4) | |
| Zuckerrübe | 100 | | |

Die in Tabelle 2.3.4 aufgeführten Lösungen kamen als zusätzliche Komponente in die reduzierten Medien, bzw. in das DSMZ Medium 104b.

Tabelle 2.3.4: Zusätzliche Lösungen

| Salzlösung 104b | | Spurenelementlösung | | Vitaminlösung | |
|---------------------------------------|-------|----------------------------------|--------|----------------------|--------|
| Substanz | [g/L] | Substanz | [mg/L] | Substanz | [mg/L] |
| CaCl ₂ x 2H ₂ O | 0,25 | ZnCl | 70 | Biotin | 2 |
| MgSO ₄ x 7H ₂ O | 0,50 | MnCl ₂ | 100 | Nicotinsäure | 20 |
| K ₂ HPO ₄ | 1,00 | CoCl ₂ | 200 | Thiamin HCl | 10 |
| KH ₂ PO ₄ | 1,00 | NiCl ₂ | 100 | 4-Aminobenzoat | 10 |
| NaHCO ₃ | 10,00 | CuCl ₂ | 20 | Pantothenat | 5 |
| NaCl | 2,00 | NaMoO ₄ | 50 | Pyridoxamin 2HCl | 71 |
| | | Na ₂ SeO ₃ | 26 | Cyanocobalamin | 20 |
| | | HCl (25%) | 1 mL | | |

2.4 Stammhaltung

2.4.1 Anlegen einer Kryokultur

C. spba. wurde mit TYA-Glucose- oder RCM-Medium in Vials bei 30 °C inkubiert bis die Kultur eine OD₅₃₅ von 4-6 und eine Butanolkonzentration von höchstens 2 g/L erreichte. In der A-Bank wurde die Kultur anschließend im Verhältnis 1:1 mit Pharmaglycerin gemischt und in Kryogefäße (Sarstedt, Nümbrecht, DE) zu je 2 mL überführt, fest verschlossen und beschriftet. Nach 30 min Einwirkzeit erfolgte das Ausschleusen aus der A-Bank und das sofortige Schockgefrieren bei -196 °C in flüssigem N₂. Die nun gefrorenen Kryokulturen wurden umgehend bei -80 °C (PLPE 4586, NationalLab GmbH, Mölln, DE) gelagert. Einen Tag später erfolgte ein Inkubationstest der Kryokulturen in 30 mL des jeweiligen Kryokultur-Mediums (TYA oder RCM), um die Regenerationsfähigkeit der Kryokultur zu prüfen.

Bei der Entnahme aus dem -80 °C Gefrierschrank konnte beobachtet werden, dass die zuvor fast klare, gelbliche Kultur nach einem Tag durch Kristallisation milchig geworden ist. Je länger die Zellen bei -80 °C lagerten desto länger wurde die Lagphase beim nächsten Regenerationsschritt. Von anfänglichen 2-3 Tagen stieg sie auf bis zu einer Woche an bzw. wuchsen die Zellen teilweise gar nicht mehr an. Nach Anmerkung der DSMZ Braunschweig [SPRING 2012] ist die Lagerung des Stamms DSM 14923 bei -80 °C in Kryogefäßen aus Kunststoff nicht geeignet und sollte stattdessen bei -196 °C in gasdichten Glasröhrchen aufbewahrt werden. Andere Arbeitsgruppen [AFSCHAR ET AL. 1990; TASHIRO ET AL. 2004; TANAKA ET AL. 2012] nutzten Sporen für die Stammhaltung. Zu Beginn dieser Arbeit konnte jedoch eine Sporenbildung unter Laborbedingungen, mit den bis dahin verwendeten Medien-Substratkombinationen nicht beobachtet werden. Bei dem hier verwendeten Stamm konnte auch durch die DSMZ mit dem DSMZ-Medium 104b keine Sporenbildung beobachtet werden [SPRING 2012].

2.4.2 Induktion der Sporenbildung

Um die Sporenbildung von *C. spba.* zu stimulieren wurde der Stamm in 50-mL-Vials mit 30 mL hefeextraktfreiem A-Medium und 100 g/L zerkleinerter Zuckerrübe als Substrat (Tabelle 2.3.3) bei 30 °C inkubiert. Bei der Probenahme nach neun Tagen konnten Sporen unter dem Phasenkontrastmikroskop (Axioplan, Carl Zeiss, Oberkochen, DE) beobachtet und bei 400-facher Vergrößerung mit Hilfe einer Zählkammer nach Thoma die Sporenanzahl bestimmt werden (Abbildung 2.4.1; Gleichung 2.4.1). Die Sporensuspension, mit einer Sporendichte von $1,5 \cdot 10^9$ Sporen pro mL, konnte direkt als Inokulum für die Herstellung von Vorkulturen genutzt werden.

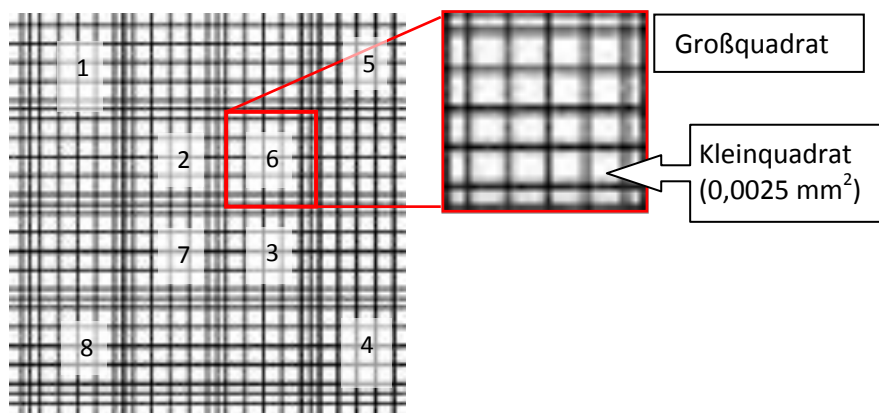


Abbildung 2.4.1: Thoma Zählkammer ($0,02 \text{ mm} \cdot 0,0025 \text{ mm}^2$), Auszählen von 8 Großquadrate á 16 Kleinquadrate mit je $0,0025 \text{ mm}^2$, ein Kleinquadrat entspricht einem Volumen von $5 \cdot 10^{-5} \mu\text{L}$

$$\text{Gleichung 2.4.1: } \text{Sporenanzahl pro mL} = \frac{\text{gezählte Sporen pro Kleinquadrat}}{\text{Volumen pro Kleinquadrat}} \cdot 1000$$

Die Sporen wurden sowohl auf ihre O_2 -Toleranz als auch auf ihre Hitzeresistenz hin getestet. Dafür sind zwei von vier Sporenansetzen 3 h lang dem Luftsauerstoff ausgesetzt worden, wovon ein Ansatz zusätzlich 5 min bei 80 °C erhitzt wurde, bevor die Sporenansätze als Inokulum in sterilem, anoxischem RCM-Medium bei 30 °C inkubierten. Die verbleibenden zwei Ansätze erfuhren, bis auf die O_2 -Exposition, die gleiche Behandlung. Schon nach 2 Tagen waren in allen Ansätzen sowohl eine Trübung des Mediums als auch aktive Zellen unter dem Mikroskop zu erkennen. Die Sporen zeigten demzufolge Toleranzen gegenüber Hitzeeinwirkung und Luftsauerstoff.

2.5 Vorkultur

Für eine Vorkultur sind anfangs 2 mL Kryokultur oder im fortgeschrittenen Teil der Arbeit 0,5 mL Sporensuspension ($1,5 \cdot 10^9$ Sporen pro mL) in 10 mL RCM- oder TYA-Glucose-Medium bei 30 °C inkubiert worden, bis eine deutliche Trübung erkennbar war. Dies dauerte, je nach Qualität der Stammhaltungskultur, 2-4 Tage. Um eine definierte Vorkultur zu erhalten, wurde die 2-4 Tage alte Kultur, je nach später verwendetem Inkubationsmedium, nochmals auf frisches TYA-, YA- oder A-Medium überimpft und für 10 bis 20 h bei 30 °C inkubiert, bis eine OD_{535} zwischen 0,5 und 1 erreicht war. In dieser aktiven Kultur, mit äußerst mobilen Zellen, konnte kaum Butanol nachgewiesen werden und diente, soweit nicht anders beschrieben, mit einem Volumenanteil von 1-2 % als direkte Vorkultur für Fermentationen oder andere Inkubationsversuche.

2.6 Testversuche in Mikrotiterplatten

Sterile 96-Well-Mikrotiterplatten (MTPs) (Sarstedt, Nümbrecht, DE) wurden in der A-Bank mit kurz zuvor beimpftem Medium befüllt. Als Verschluss dienten eine Rotilabo® Abdeckfolie (Roth, Karlsruhe, DE) sowie der passende Deckel welcher am Rand zusätzlich mit Parafilm® (BRAND GmbH + CO KG, Wertheim, DE) 3-lagig abgedichtet wurde. So verschlossen, konnten die MTPs ausgeschleust und zügig in einen FLUOstar Omega-Plattenreader (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, DE) mit N₂-Begasung zur weiteren anoxischen Inkubation bei 30 °C überführt werden. Die stündliche OD-Messung erfolgte bei 535 nm. Nach 22 h wurde der Versuch abgebrochen.

Ein weiterer Testversuch im BMG-Plattenreader sollte klarstellen, ob die gebildeten Endprodukte aus den Wells der MTPs entweichen können. Dazu wurde der sterile Überstand einer abgeschlossenen Fermentation mit bekannten Produktkonzentrationen für 5 Tage bei 27 °C mit N₂-Begasung im Plattenreader inkubiert. Die Start- und Endproben sind zum Vergleich in einer HPLC vermessen worden.

2.7 Versuche im Vialmaßstab

Vialversuche fanden als 3-fach Ansätze in 20-mL-, 50-mL- oder 100-mL-Glasvials (Machery Nagel, Düren, DE) statt. 20-mL-Vials enthielten 10 mL, 50-mL-Vials 30 mL

und 100-mL-Vials 50 mL Medienvolumen. Nicht wasserlösliche Substrate (Rohsubstrate) wurden in einer Sterilwerkbank in Vials eingewogen, nachfolgend in die A-Bank eingeschleust und mit entsprechendem Medium vereinigt. Das Medium wurde unter anoxischen Bedingungen in Vials überführt und gasdicht verschlossen. Das Einstellen des pH-Wertes erfolgte mit steriler 5 M NaOH-Lösung. Bei Verwendung eines unsterilen Rohsubstrats ist der gesamte verschlossene Ansatz nochmals autoklaviert worden. Die mit Vorkultur beimpften Ansätze inkubierten stehend im temperierten Wasserbad (GFL 1002/1005, Burgwedel, DE). Die Startprobenahme (0,5 mL) erfolgte direkt nach dem Animpfen mit Vorkultur. Da durch die Inkubation Gase gebildet wurden, die einen Überdruck von bis zu 4 bar in den Vials erzeugten, war aus Sicherheitsgründen ein Druckausgleich vor jeder Probenahme mit Hilfe einer sterilen Einwegkanüle notwendig. Um einen Eintrag von Luftsauerstoff durch die Probenahme zu vermeiden erfolgte der Druckausgleich nicht vollständig, damit ein geringer Restdruck im Vial verblieb. Dies erleichterte zudem die Probenahme mit den N₂-gespülten Einwegspritzen.

2.7.1 Allgemeine Probenaufbereitung (für alle Maßstäbe angewendet)

Für die OD-Bestimmung und mikroskopische Untersuchungen wurde die frisch gezogene Probe (0,5 mL) in 1,5 mL Reaktionsgefäße (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE) überführt und ordentlich durchmischt (Vortex Genie 2, Bender & Hobein AG, Zürich, CH). Für die OD-Bestimmung kamen 100 µL der Zellkultur zur entsprechenden Verdünnung (1:10 bzw. 1:20) in eine 1 mL Standard-Küvette (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE). Die restliche Probe (0,4 mL) wurde 20 min bei Raumtemperatur und 20800 g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417, Engelsdorf, DE). Für die Bestimmung organischer Säuren, Alkohole und Zucker mittels HPLC wurden 100 µL des Überstandes in HPLC-Glasvials (CS-Chromatographie GmbH, Langerwehe, DE) überführt und mit 0,5 mM H₂SO₄ 1:10 verdünnt. Der restliche Überstand (0,3 mL) ist zur Bestimmung des pH-Wertes (InLabMicro, Mettler-Toledo, Gießen, DE mit WTW 340i, Weilheim, DE) in ein frisches 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt worden, wonach er als Rückstellprobe bei 4 °C lagerte.

2.8 Substrattests

2.8.1 Mono und Disaccharide

Die verschiedenen Zucker wurden als Stammlösung bis zu den in Tabelle 2.8.1 angegebenen Konzentrationen zum YA-Medium zugegeben und mit *C. spba.* bei 27 °C für 8 Tage inkubiert. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erhalten erfolgte eine Umrechnung der ermittelten Konzentrationen in Ertrag [$\text{g}_{\text{Produkt}}/\text{g}_{\text{Substrat}}$] bzw. [$\text{mM}_{\text{Produkt}}/\text{mM}_{\text{Substrat}}$].

Tabelle 2.8.1: Getestete Mono- und Disaccharide mit deren eingewogenen Konzentrationen

| Substrat | C-Atome | [mM] | [g/L] |
|------------------------------|---------|------|-------|
| D-Arabinose | 5 | 100 | 15,0 |
| L-Arabinose | 5 | 59 | 8,9 |
| D-Ribose | 5 | 100 | 15,0 |
| D-Xylose | 5 | 100 | 15,0 |
| D-Fructose | 6 | 100 | 18,0 |
| D-Galactose | 6 | 100 | 18,0 |
| D-Glucose · H ₂ O | 6 | 100 | 19,8 |
| D-Mannose | 6 | 100 | 18,0 |
| L-Rhamnose | 6 | 100 | 18,0 |
| D-Lactose | 12 | 100 | 34,2 |
| D-Maltose · H ₂ O | 12 | 95 | 34,2 |
| D-Saccharose | 12 | 29 | 10,0 |
| Trehalose | 12 | 100 | 34,2 |

2.8.2 Glycerin

In 50-mL-Vials wurden 30 mL YA-Medium mit 40 g/L Pharmaglycerin unter sterilen, anoxischen Bedingungen vereint. Nach Inokulieren und Entnahme der Startprobe inkubierten die Ansätze im Wasserbad bei 30 °C, außerhalb der A-Bank. Nach 120 h erfolgte die Endprobenahme.

2.8.3 Galacturonsäure

Die Zusammenstellung der Ansätze mit Galacturonsäure erfolgte ebenfalls unter anoxischen Bedingungen. Hier wurde das Substrat als sterile, konzentrierte Stammlösung mit einer Konzentration von 10 g/L zum Medium hinzugefügt. Der pH-Wert wurde mit 5M NaOH auf 5,8 eingestellt. Die Startproben, nach Beimpfen des Ansatzes, sowie die Endproben, nach 150 h Inkubation im Wasserbad bei 30 °C, wurden für die jeweiligen analytischen Methoden aliquotiert, aufbereitet und gelagert.

2.8.4 Rohsubstrate

2.8.4.1 *Weizenkaff, Weizenkleie, Orangenschale und ausgelaugte/entpektinisierte Orangenschale*

Die Rohsubstrate Weizenkaff (Ernte 2011, Agravis, Region Ambergau, DE), Weizenkleie (Südzucker AG, Mannheim, DE), Orangenschale und ausgelaugte/entpektinisierte Orangenschale (Cargill GmbH, Malchin, DE) wurden jeweils bei 60 °C für 24 h getrocknete (UM400, Memmert GmbH & Co KG, Schwabach, DE) und mit einer Messermühle (Retsch Grindomix GM 200, Haan, DE) bei 10000 RPM 30 Sekunden lang in zwei Sekunden Intervallen zerkleinert (Abbildung 2.8.1). Das zerkleinerte Substrat ist in Kunststoffflaschen (Nalgene, Thermo Scientific, Schwerte, DE) überführt, nochmals für 24 h bei 60 °C getrocknet und verschlossen worden. Für die Vialansätze kamen jeweils 50 g/L Substrat zum Einsatz, welches mit sterilem, anoxischem YA-Medium vereinigt wurde. Die gasdicht verschlossenen 30-mL-Ansätze wurden bei 121 °C und 1 bar für 15 min autoklaviert. Nach dem Animpfen mit *C. spba.* und der Startprobenahme inkubierten die Ansätze im Wasserbad bei 30 °C. Die Endprobenahme erfolgte nach 150 h Inkubation.

Material und Methoden



Abbildung 2.8.1: Im Vialversuch eingesetzte Rohsubstrate, zerkleinert und getrocknet sowie die bei 27 °C inkubierten 30-mL-Ansätze mit YA-Medium und 50 g/L des jeweiligen Substrats

2.8.4.2 Weizenkaff-Hydrolysat

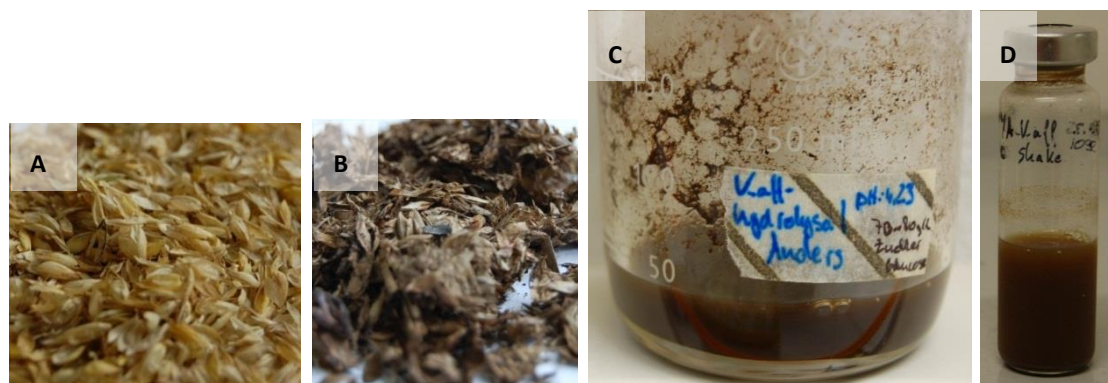


Abbildung 2.8.2: Weizenkaff unbehandelt (A), nach Organosolv Vorbehandlung (B), nach enzymatischer Hydrolyse mit 10 FPU Biogazyme 2x, ausgepresst (C), 20-mL-Vialansatz mit Weizenkaff-Hydrolysat und YA-Medium (D)

Das in Abbildung 2.8.2 A dargestellte unbehandelte Weizenkaff wurde mit dem Organosolv-Verfahren (2 h, 200 °C, 75 % Ethanol) vorbehandelt (Abbildung 2.8.2 B). Dadurch wurden Hemicellulosen und Cellulose für die folgende enzymatische

Hydrolyse (50 °C, pH-Wert 4,5, Einsatz von 10 FPU Biogazyme 2x-Enzymmischung) (ASA-Spezialenzyme GmbH, Wolfenbüttel, DE) besser zugänglich [ANDERS 2013]. Um die Festbestandteile des Hydrolysates von der flüssigen Phase zu trennen wurde es mit einer Tinkturenpresse (HP 2H, FISCHER Maschinenfabrik GmbH, Neuss, DE) bei 400 bar ausgepresst bis ein trockener Presskuchen zurückblieb, welcher entsorgt wurde. Nach dem Autoklavieren des Hydrolysates (Abbildung 2.8.2 C) ist eine Probe zur Ermittlung des Gesamt-Zuckergehaltes entnommen worden. Das Hydrolysat enthielt in Lösung eine Gesamt-Zuckerkonzentration von 80 g/L, was einer ausreichenden Substratkonzentration für Batchversuche entsprach. Nachfolgend fand unter anoxischen Bedingungen die Komplettierung zu YA- oder A-Medium mit sterilen, konzentrierten Stammlösungen statt. Abgefüllt zu je 10 mL und verschlossen in 20-mL-Vials (Abbildung 2.8.2 D) wurden die Ansätze ausgeschleust, anschließend inokuliert sowie eine Startprobe entnommen. Nach 120 h Inkubation bei 27 °C erfolgte die Entnahme der Endprobe.

Bei Ansätzen mit ungefilterten komplexen Substraten, wie Weizenkaff, Weizenkaff-Hydrolysat, Weizenkleie, Orangenschale oder Zuckerrübe konnte die Zelldichte nicht über die OD₅₃₅-Messung ermittelt werden, da die Eigentrübung des Mediums durch Schwebstoffe keine exakte Absorptionsmessung zuließ.

2.8.4.3 Zuckerrübe

Eine ganze frische, gewaschene Zuckerrübe wurde in 4-5 cm große Stücke zerschnitten und ebenfalls mit einer Messermühle, wie oben beschrieben (siehe 2.8.4.1, Seite 37), zerkleinert. Die in Schraubglasflaschen überführten Zuckerrübenschnitzel wiesen eine Größe von 0,5-3 mm auf und wurden für 15 min bei 121 °C und 1 bar autoklaviert. Die weitere Zerkleinerung zu einem Mus war nicht sinnvoll, da bei Einsatzmengen von mindestens 100 g/L eine zu hohe Viskosität im Medium entstand, was zu einer erschwerten Durchmischung und Beprobung der Ansätze führte. Für eine Zuckerrübenkonzentration von 100 g/L wurden unter sterilen Bedingungen jeweils 3 g Zuckerrübenschnitzel in 50-mL-Vials eingewogen, danach in die A-Bank eingeschleust und unter anoxischen Bedingungen mit sterilem, anoxischem YA- oder A-Medium auf 30 mL aufgefüllt und gasdicht verschlossen (Abbildung 2.8.3).

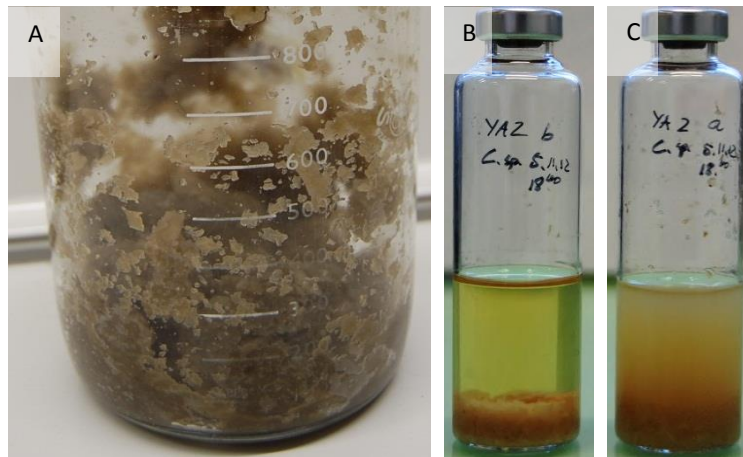


Abbildung 2.8.3: Zerkleinerte, autoklavierte Zuckerrübe (A), YA-Medium mit 100 g/L Zuckerrübe (B), bei 27 °C inkubierter Zuckerrübenansatz (C)

Außerhalb der A-Bank konnten die Ansätze mit aktiver Vorkultur beimpft und bei 27 °C im Wasserbad stehend inkubiert werden. Nach 21 Tagen erfolgte die Endprobenahme.

2.9 Versuche in 100-mL-Schraubglasflaschen mit und ohne Gasfreisetzung bzw. Rührung

Zur Untersuchung des Einflusses der Durchmischung und Gasfreisetzung auf die Produktbildung fanden drei getrennte Versuche in 100-mL-Schraubglasflaschen mit 3 mm x 20 mm Magnetrührstäbchen (neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, DE), zur eventuellen Durchmischung, statt. Um einen Eintrag von O₂ zu verhindern, wurden zum Verschließen 3 cm dicke Butylgummistopfen (Glasgerätebau Ochs, Bovenden/Lengler, DE) verwendet. Ein Entweichen der Gase ohne O₂-Eintrag konnte durch zusätzlich eingepasste Gärröhrchen in den Butylgummistopfen erreicht werden (Abbildung 2.9.1). Das Zusammenstellen der jeweiligen Medien (TYA-, YA- und A-Medium) fand unter anoxischen Bedingungen statt. Nach dem Einschleusen der sterilen mit Magnetrührstäbchen, Stopfen und gegebenenfalls mit Gärröhrchen versehenen Schraubglasflaschen in die A-Bank, wurden diese vorsichtig geöffnet, mit 60 mL Medium befüllt und direkt wieder verschlossen. Die Gärröhrchen wurden durch Befüllen mit 1 mL sterilem Reinstwasser gasdicht verschlossen und mit Alufolie (Abbildung 2.9.1) oder Parafilm®, als Staub- und Verdunstungsschutz, abgedeckt.



Abbildung 2.9.1: 100 mL Schraubglasflaschen mit gasdichten Butylgummistopfen und Magnetrührstäbchen, die Gärröhrchen dienten zum Entweichen der Gase aus den 60 mL Kulturen.

Außerhalb der A-Bank erfolgte die Inokulation sowie die Startprobenahme der Ansätze mit sterilen Spritzen (siehe 2.1, Seite 26) in einer Sterilwerkbank. Die Inkubation der Stand- und Rührkulturen fand in einem Infors HT Multitron-Inkubator (Bottmingen, CH) bei 30 °C statt. Die synchrone Rührung mehrerer Ansätze bei 150-250 RPM stellte ein VARIOMAG® Poly 15-Rührer (H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim, DE) sicher. Geschüttelte Ansätze inkubierten bei 30 °C bzw. 26 °C in einem Infors HT RFI 125-Inkubator (Bottmingen, CH) bei 150 RPM mit einer Auslenkung von 25 mm. Nach etwa 100 h erfolgte die erste Probenahme, um die Substratkonzentration zu überprüfen. Je nach Restsubstratgehalt erfolgten weitere Probenahmen nach 114 h oder 168 h. Die Endprobenahme erfolgte ebenfalls in einer Sterilwerkbank.

Die Inkubation und Endprobenahme der Ansätze ohne Gärröhrchen erfolgte mit größter Vorsicht, da sich in den nicht entgasten Ansätzen Überdrücke von bis zu 4 bar entwickelten und Explosionsgefahr bestand. Ansätze mit Überdruck wurden vor der Probenahme mit einer sterilen Einwegkanüle entgast. Die Probenaufbereitung erfolgte, wie unter Kapitel 2.1, Seite 26 beschrieben.

2.10 Versuche im Reaktormaßstab

2.10.1 Aufbau

Es standen zwei Reaktorstände zur Verfügung, die an die Prozessbedingungen angepasst und mit unterschiedlichen Glasreaktoren mit Arbeitsvolumina von 150 mL, 500 mL und 1000 mL betrieben werden konnten (Abbildung 2.10.1). In Tabelle 2.10.1, Seite 43 und Tabelle 2.10.2, Seite 44 sind die jeweiligen Komponenten der Reaktorstände aufgelistet. Zur Abdichtung der Anschlüsse an den Reaktoren dienten passende, mit PTFE-beschichtete Butylgummisepten, welche bei Bedarf mit entsprechenden Aussparungen für die jeweilige Durchleitung versehen wurden.

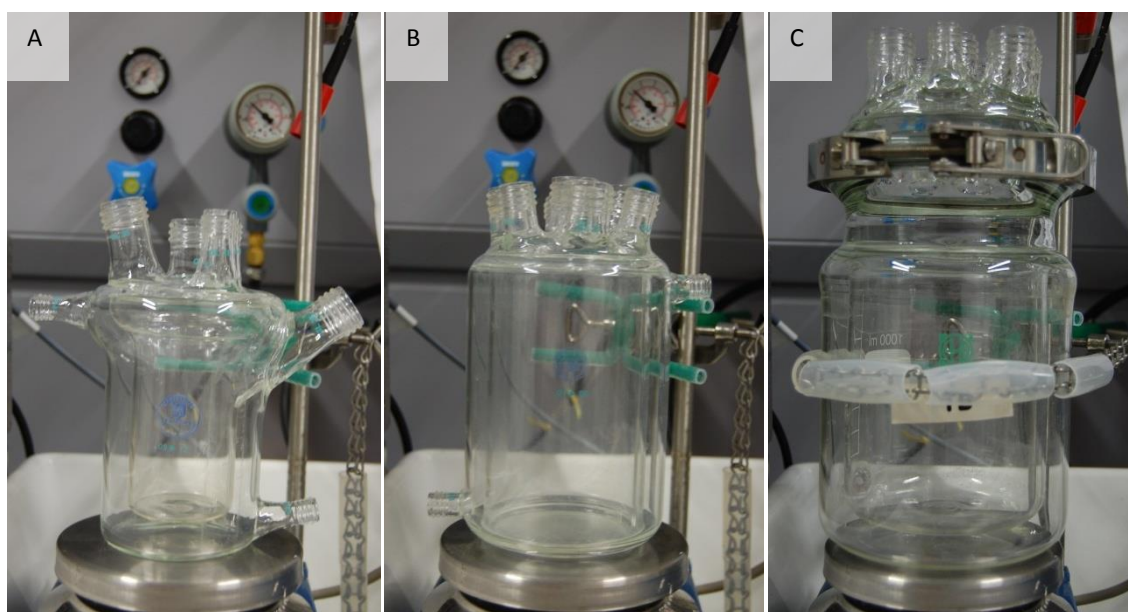


Abbildung 2.10.1: Verwendete Glasreaktoren mit 150 mL (A), 500 mL (B) und 1000 mL (C) Arbeitsvolumen

Das Auslesen und Speichern von Daten sowie das Umrechnen der durch einen A/D-Wandler (ACLD-8125-Terminal Board, LiPPERT ADLINK Technology GmbH, Mannheim, DE) umgewandelten Analogsignale (im Analogsystem) für Temperatur, Redoxpotential und pH-Wert übernahm die programmierbare Steuerungssoftware DASYLab® 9 bzw. 10 (National Instruments Corporation, Austin, TX, USA).

Material und Methoden

Tabelle 2.10.1: Geräteliste des digitalen Doppelfermentersystems, grau hinterlegte Komponenten wurden im Zuge der Optimierung durch *kursiv* dargestellte Komponenten ersetzt.

| Gerät | Typ | Hersteller/Vertrieb |
|--|-------------------------------------|--|
| O ₂ -Gasfilter für N ₂ -Begasung | GasClean™ Oxygen Filter | Agilent/Varian, Inc., Palo Alto, CA, USA |
| 2 x Begasungsfritte | HPLC-Zubehör Sintermetall | unbekannt |
| Gasdurchflussmesser | Q55-AV-S1-M-An.nA - A | HTK, Hamburg, Dtl |
| 2 x Abluftsterilfilter | Midisart 2000® 0,2 µm | Sartorius-Stedim Biotech GmbH, Göttingen, DE |
| 2 x Reaktor 150 mL 2 x Reaktor 500 mL | Maßanfertigung | W.O.Schmidt, Braunschweig DE |
| 2 x Magnetrührstäbchen | 20 x 0,6 mm | Bürkle GmbH, Bad Bellingen, DE |
| 2 x Magnetrührer | IKAMAG REO/RCT | IKA Labortechnik GmbH & CO KG, Staufen, DE |
| 2 x Glas-Gärröhrchen | <i>unbekannt</i> | <i>W.O.Schmidt, Braunschweig DE</i> |
| 2 x Abluftkühler | <i>unbekannt</i> | <i>W.O.Schmidt, Braunschweig DE</i> |
| 2 x Abluftsterilfilter | Midisart 2000® 0,2 µm | Sartorius-Stedim Biotech GmbH, Göttingen, DE |
| 2 x einstellbare Druckbegrenzungsventile mit Manometer | DVU 01-2 | Landefeld Druckluft und Hydraulik GmbH, Kassel-Industriepark, DE |
| 2 x Gaswaschflaschen | DURAN® GROUP | Labware SCHOTT AG, Mainz, DE |
| gasdichte Schläuche | Norprene A 60 F/G | Saint-Gobain, Charny, FR |
| 2 x Metall-Hahn | Luer-Lock | neoLabMigge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, DE |
| 2-3 x Kryostate (4,5 L) | F25 | Julabo, Seelbach, DE |
| 2 x pH/T-Messkette 2 x Redoxelektrode | SL 81-120pHT SL 89-225PT | SCHOTT Instruments GmbH, Mainz, DE |
| 2 x pH/mV/T-Multimeter | 340i | WTW, Weilheim, DE |
| serielle Interfacebox | C320 Turbo (1x) und C32047T (2x) | Moxa, Brea, USA |
| Steuerungssoftware | DASYLab 10 | National Instruments Corporation, Austin, TX, USA |

In den ersten Fermentationen wurden anoxische Bedingungen durch eine kontinuierliche Begasung mit N₂ oder H₂ über eine Begasungsfritte im Reaktor realisiert. Vorab durchliefen die Gase einen GasClean™ Oxygen-Filter (Agilent/Varian, Inc., Palo Alto, CA, USA) sowie einen Sterilfilter (Midisart 2000® 0,2 µm, Sartorius-Stedim Biotech GmbH, Göttingen, DE), um Restsauerstoff und mögliche Kontaminationen zu eliminieren. Alle Gase entwichen über einen Abluftkühler (W.O. Schmidt, Braunschweig, DE), Sterilfilter und eine Gaswaschflasche (DURAN®GROUP, Labware SCHOTT AG, Mainz, DE) mit 1 M NaOH-Lösung, um Verdunstungsverluste, Keimbelastungen oder Geruchsbelästigungen durch flüchtige organische Säuren und Lösungsmittel zu minimieren. Einer eventuellen Schaumbildung konnte mit der Zugabe

Material und Methoden

von 10-20 µL eines Antischaummittels (Struktol® J 633, Schill + Seilacher "Struktol" GmbH, Hamburg, DE) entgegengewirkt werden.

Tabelle 2.10.2: Geräteliste des analogen Doppelreaktorsystems, grau hinterlegte Komponenten wurden im Zuge der Optimierung durch *kursiv* dargestellte Komponenten ersetzt.

| Gerät | Typ | Hersteller/Vertrieb |
|--|--|---|
| O ₂ -Gasfilter für N ₂ -Begasung | GasClean™ Oxygen Filter | Agilent/Varian, Inc., Palo Alto, CA, USA |
| Gasdurchflussmesser | 8-125 mL/min, 1 bar N ₂ | Bailey-Fischer & Porter, Göttingen, DE |
| 2 x Begasungsfritte | HPLC-Zubehör Sintermetall | unbekannt |
| 2 x Reaktor 150 mL 2 x Reaktor 500 mL | Maßanfertigung | W.O.Schmidt, Braunschweig DE |
| 2 x Reaktor 1000 mL | Maßanfertigung | Glasgerätebau Ochs, Bovenden/Lenglern, DE |
| Kryostat (4,5 L) | F25 | Julabo, Seelbach, DE |
| Kryostat(13 L) | MGW Lauda K4R | Messgerätekwerk Lauda, Dr.R.Wobser KG, Lauda- Königshofen |
| 2 x Magnetrührstäbchen | 20 x 0,6 mm/40 x 0,6 mm | Bürkle GmbH, Bad Bellingen, DE |
| 2 x Magnetrührer | IKAMAG REO | IKA Labortechnik GmbH & CO KG, Staufen, DE |
| 2 x Glas-Gärröhrchen | <i>unbekannt</i> | <i>W.O.Schmidt, Braunschweig DE</i> |
| 2 x Abluftkühler | <i>unbekannt</i> | <i>W.O.Schmidt, Braunschweig DE</i> |
| 2 x Abluftsterilfilter | Midisart 2000® 0,2 µm | Sartorius-Stedim Biotech GmbH, Göttingen, DE |
| 2 x einstellbare Druckbegrenzungsventil mit Manometer | DVU 01-2 | Landefeld Druckluft und Hydraulik GmbH, Kassel-Industriepark, DE |
| gasdichte Schläuche | Norprene A 60 F/G | Saint-Gobain, Charny, FR |
| Schlauchpumpe | ECOLINE VC-360 | ISMATEC SA, Glattbrugg, CH |
| 2 x Gaswaschflaschen | DURAN® GROUP | Labware SCHOTT AG, Mainz, DE |
| 2 x pH/T-Messkette 2 x Redoxelektrode 2 x Analog-Transmitter | InPro3100 Pt4805-DPAS-SC-K8S M300 (pH/mV/Temp/pO ₂) | Mettler Toledo GmbH, Gießen, DE |
| A/D-Wandler | DB-8225 Terminal Board | ICPDAS-Europe GmbH Reutlingen, DE |
| Steuerungssoftware | DASYLab 9 | National Instruments Corporation, Austin, TX, USA |

Im Zuge der Optimierungen wichen die zuvor verwendete Begasungsfritte zur N₂- oder H₂-Begasung sowie der Abluftkühler einem Gärröhrchen mit nachgeschaltetem Druckbegrenzungsventil (DVU 01-2, Landefeld Druckluft und Hydraulik GmbH, Kassel-Industriepark, DE) (siehe Abbildung 2.10.2, Seite 45, Abbildung 2.10.3, Seite 46). Zum Schutz der nicht druckfesten Glasreaktoren sind die Druckbegrenzungsventile auf einen Auslösedruck von 0,2 bar Überdruck eingestellt worden.

Material und Methoden

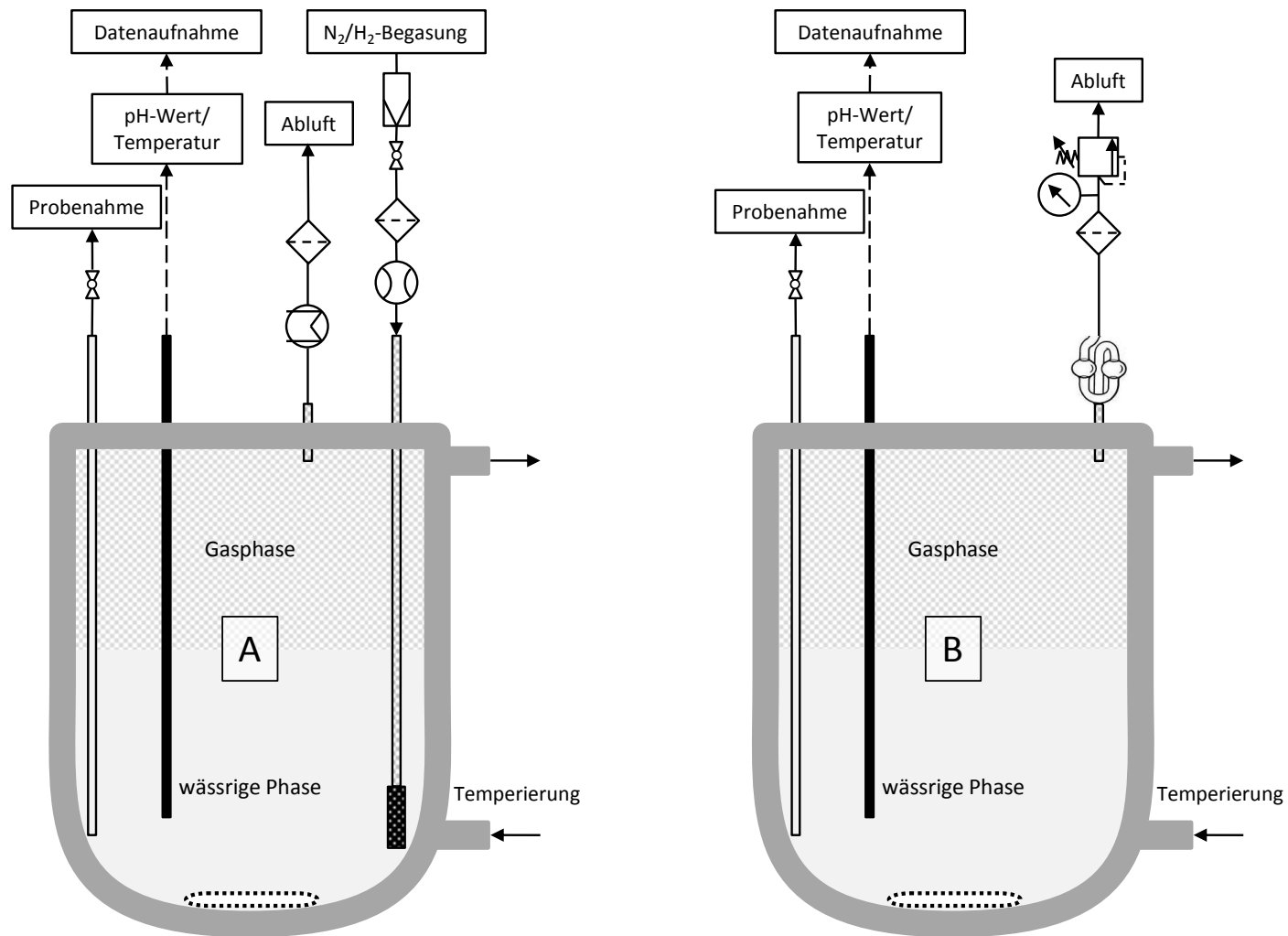


Abbildung 2.10.2: Schematische Darstellung der Reaktoren vor der Optimierung (A) mit Be- und Entgasung sowie nach der Optimierung (B) mit Gärröhrchen und Druckbegrenzungsventil zur Gasrückhaltung.

Durch die zusätzliche Funktion der Gärröhrchen als Blasenähler konnte, über die dadurch sichtbare Gasbildung, die aktuelle Aktivität der Fermentationskultur abgeschätzt werden. Dies war hilfreich, um eventuelle Maßnahmen wie die Zugabe von Substrat und Supplinen einzuleiten oder Probenahme-Zeitpunkte abzuschätzen. In beiden Systemen konnte der Überdruck, abhängig von der Gasbildungsintensität während der Fermentation, auch auf 0,3 bar ansteigen. Dieser fiel aber mit sinkender Stoffwechselaktivität wieder ab. Die Rührgeschwindigkeit wurde, im Zuge der Optimierung, von ursprünglich 500 RPM auf 200-300 RPM angepasst. Die Zugabe eines Antischaummittels war nicht mehr nötig, da die Schaumbildung aufgrund des Überdrucks und der geringeren Durchmischung deutlich zurück ging.

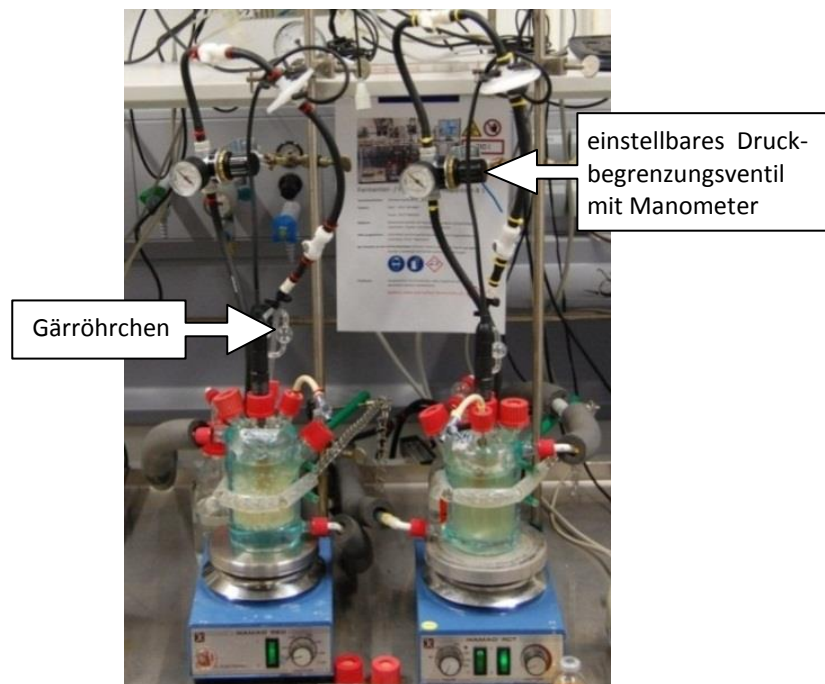


Abbildung 2.10.3: Optimiertes Doppelfermentersystem mit 150 mL Reaktoren (Kultivierung mit Lentikats® und freien Zellen)

Die Medien wurden auch hier in der A-Bank vorbereitet und in die autoklavierten Reaktoren überführt. Die gasdicht verschlossenen Reaktoren sind nach dem Ausschleusen aus der A-Bank an Kryostaten (F25, Julabo, Seelbach, DE; MGW Lauda K4R, Dr. R. Wobser KG, Lauda-Königshofen), Druckbegrenzungsventile mit Abgasleitungen und digitale Multimeter (WTW 340i, Weilheim, DE) bzw. Analogtransmitter (M300, Mettler Toledo GmbH, Gießen, DE) angeschlossen worden. Nach Erreichen der eingestellten Temperatur und dem gegebenenfalls notwendigen Einstellen des pH-Wertes erfolgte die Inokulation der Reaktoransätze. Durch die mit 70 %igem

Ethanol desinfizierten Septen wurden 2 % Vorkultur mit Hilfe einer N₂-gespülten Einwegspritze (Ominfix® Braun, Melsungen AG, Melsungen DE) in die Reaktoren injiziert und die Datenaufzeichnung durch DASYLab® gestartet. Die umgehende Entnahme der Startprobe, sowie alle weiteren Probenahmen erfolgten über einen abflammbaren Metall-Kugelhahn mit Luer-Lock-Anschluss (neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, DE) und Einwegspritzen (Injekt®Solo, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE). Das Probenvolumen betrug bei 150-mL-Reaktoren 0,5 mL und bei 500-mL- und 1000-mL-Reaktoren 1 mL. Die Aufbereitung der Proben erfolgte wie unter Kapitel 2.7.1 auf Seite 35 beschrieben. Aus dem Langzeitversuch (2.10.3, Seite 49) wurden am Ende eines Batches 50 mL Probe für die OD₅₃₅- und BTM-Bestimmung abgefüllt.

Abbruch einer Fermentation

Anzeichen für ein Ende und somit für einen Abbruch einer Batch-Fermentation waren:

- eine stagnierende Gasbildung (keine Gasblasen in Gärröhrchen)
- abfallender Überdruck (Manometer)
- keine pH-Wertänderung
- die Beobachtung mehrheitlich lysierter Zellen unter dem Mikroskop (Abbildung 3.7.1, Seite 94)
- keine Veränderung in den Substrat- und Produktkonzentrationen

Nach dem Ende der Fermentation erfolgte, nach dem Stoppen der Datenaufzeichnung, die Abschaltung der Kryostaten und Magnetrührer sowie das Trennen aller Anschlüsse vom Reaktor. Die Reaktoren wurden mit Elektroden, Abluft-Sterilfilter und allen mit Zellkultur in Verbindung gekommenen Schläuchen bei 121 °C für 20 min sterilisiert und anschließend gereinigt.

2.10.2 Immobilisierung des Biokatalysators

***C. saccharoperbutylacetonicum* in LentiKats®**

Da die Immobilisierung unter oxischen Bedingungen stattfand, wurde eine Sporensuspension statt vegetativer Zellen von *C. spba.* verwendet, die gegenüber Hitze- und O₂-Einfluss tolerant waren (siehe 2.4.2, Seite 33).

Material und Methoden

Nach Verflüssigen von 100 mL LentiKat®Liquid (geniaLab®, Braunschweig, DE), durch vorsichtiges Erhitzen in einer Mikrowelle bei 800 W, kühlte das LentiKat®Liquid unter Rühren, bei Raumtemperatur auf 60 °C ab. In der Sterilwerkbank wurden 30 mL Sporensuspension mit einer Konzentration von $1,5 \cdot 10^9$ Sporen pro mL mit 100 mL LentiKat®Liquid vermischt und auf eine Petrischale (ø 145 mm, Nalgene, Roskilde, Dänemark) überführt. Mit einem LentiKat®Printer (Abbildung 2.10.4) wurden auf weitere zuvor ausgewogene Petrischalendeckel, wie mit einem Stempel, pro Deckel 400 flüssige LentiKats® gedruckt und mit dem passenden Boden abgedeckt.

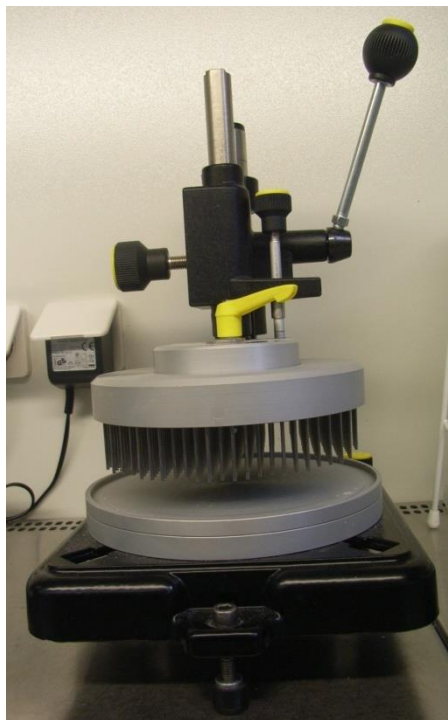


Abbildung 2.10.4: LentiKat®Printer zum Drucken von 400 LentiKats® gleichzeitig [JAHNZ 2000]

Unter einem Abzug mit zusätzlicher Ventilation erfolgte die weitere Trocknung der LentiKats® in den geöffneten Deckeln bis zu einer Masse von 28 % der ursprünglichen Feuchtmasse. Die weitere Trocknung der LentiKats® wurde durch Zugabe der 10-fachen Menge (w/v) LentiKat®Stabilizer-Lösung gestoppt und in Bechergläser mit Magnetrührstäbchen überführt, welche in die A-Bank eingeschleust wurden. Dort konnten sie 2 h unter anoxischen Bedingungen und ständiger Rührung rückquellen, wobei sie ihre typische Linsenform erhielten (Abbildung 2.10.5).



Abbildung 2.10.5: Auflichtmikroskopische Aufnahme eines LentiKats® mit, durch Carbol-Fuchsin angefärbten Kolonien, Carl Zeiss Stemi SV8, nach 1000 h, Messbalken entspricht 500 µm

Im Anschluss wurden die LentiKats® mit 0,9 %iger NaCl-Lösung zweimal gewaschen und danach in frischer 0,9 %iger NaCl-Lösung aufbewahrt. Anschließend wurden sie kurz mit frischem Medium gespült, bevor sie in neuem Medium inkubierten.

2.10.3 Langzeitversuch im repeated-Batch

15 g mit YA-Glucose-Medium gespülte LentiKats® sind mit 125 mL YA-Glucose-Medium gemischt und in einen 150-mL-Reaktor überführt worden. Als Referenz wurde ein zweiter 150-mL-Reaktor mit freien Zellen in 125 mL YA-Glucose-Medium angesetzt, welcher mit 1,5 mL Sporensuspension ($1,5 \cdot 10^9$ Sporen pro mL) inokuliert wurde. Beide Reaktoren sind nach dem Ausschleusen an den digitalen Reaktorstand (Abbildung 2.10.3, Seite 46) angeschlossen und unter optimierten Bedingungen (27 °C, 0,2-0,3 bar und 300 RPM) inkubiert worden. Die höhere Rührgeschwindigkeit war notwendig, um die LentiKats® in Schwebelage zu halten (Abbildung 2.10.6 A).

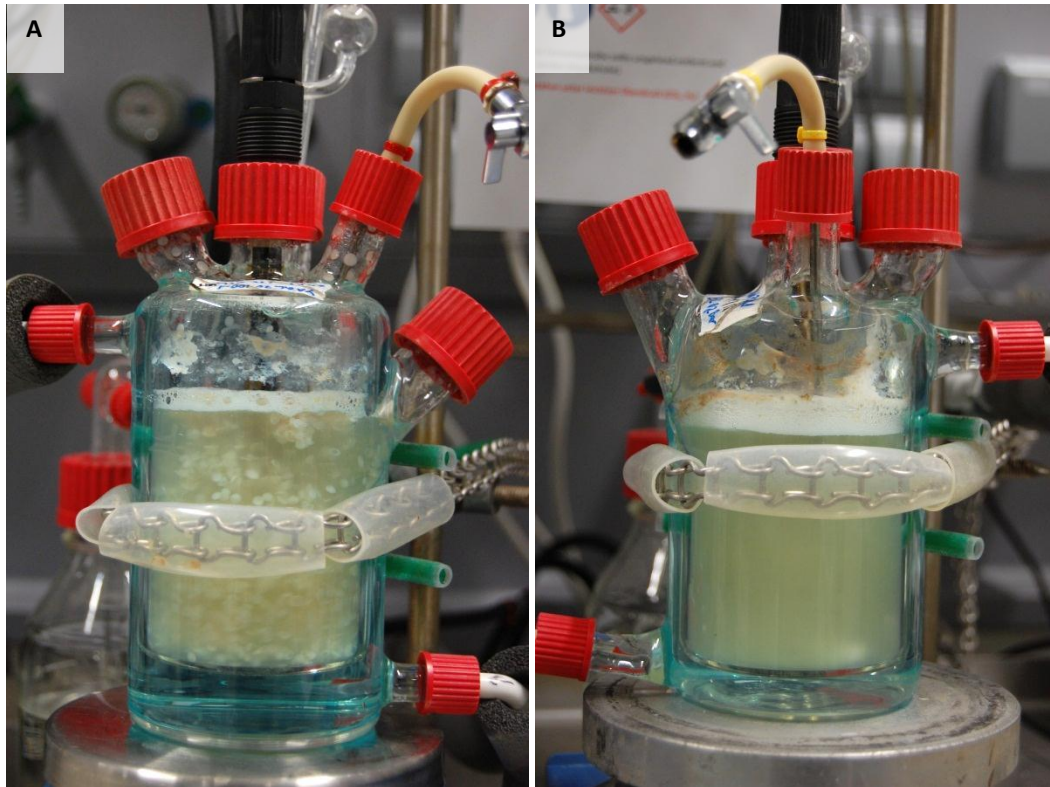


Abbildung 2.10.6: 150 mL Batch-Reaktoren im Langzeitversuch mit LentiKats® (A) und freien Zellen (B) in YA-Glucose-Medium, 27 °C, 300 RPM

Für einen Medienwechsel wurden die Reaktoren vom Reaktorstand genommen und in die A-Bank eingeschleust. Anschließend sind jeweils 100 mL durchmischte Fermenterbrühe auf zwei 50 mL Zentrifugenröhrchen aufgeteilt worden. Diese dienten zur Bestimmung der BTM, der OD_{535} und des pH-Wertes sowie der Substrate und Produkte. Beim immobilisierten Ansatz wurden die LentiKats® beim Abgießen der Fermenterbrühe sowie beim zweimaligen Waschen mit 0,9 %iger NaCl-Lösung und anschließendem Waschen mit frischem YA-Medium mit Hilfe eines sterilen Siebes zurückgehalten. Im Ansatz mit freien Zellen verblieben 10 mL Kulturbrühe als Inokulum im Reaktor. Beide Ansätze wurden mit frischem YA-Glucose-Medium aufgefüllt, durch vorsichtiges Schwenken vermischt und für die Startprobe beprobt. Abhängig von den Endkonzentrationen der jeweiligen, als Inokulum verwendeten, restlichen oder der an den LentiKats® befindlichen Fermenterbrühe variierten die Startkonzentrationen der Medienkomponenten und Produkte nach dem Medienwechsel. Nach dem Anschließen der Reaktoren an den Reaktorstand wurde die Fermentation unter optimierten Bedingungen weiter geführt. Beim Medienwechsel erfolgte die Entnahme weniger LentiKats® zur mikroskopischen Untersuchung (Abbildung 2.10.7).

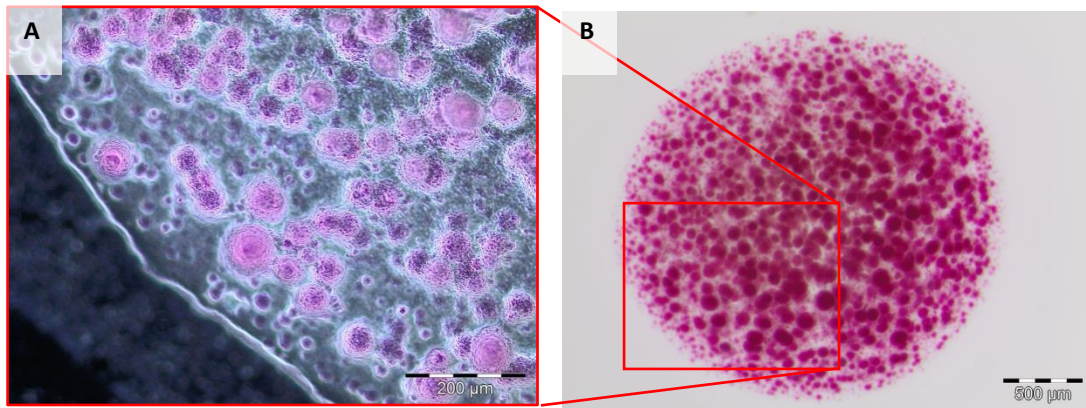


Abbildung 2.10.7: Mikroskopische Aufnahmen der mit Carbol-Fuchsin gefärbten Kolonien in LentiKats® aus dem Langzeitversuch nach 1000 h, (A) Zeiss Axioplan, Auflicht, Messbalken = 200 µm; (B) Zeiss Stemi SV8, Durchlicht, Messbalken = 500 µm

2.10.4 Extraktionsmittel-Toxizitätstest

Unter anoxischen Bedingungen wurden 5 mL TYA-Medium mit 10 g/L Glucose in sterile 20-mL-Vials überführt und mit 5 mL Extraktionsmittel überschichtet. Zu den getesteten Extraktionsmitteln gehörten 1-Decanol, 1-Dodecanol, Isofol®12, -14T, -16 und -20 sowie n-Heptan. Die Isofol®-Varianten sind auf Seite 2 beschrieben. Danach wurden die Ansätze gasdicht verschlossen und bis zur Emulsionsbildung, kurz und kräftig von Hand geschüttelt. Außerhalb der A-Bank erfolgte, nach Trennung der Phasen, das Beimpfen der Ansätze mit 0,5 mL Vorkultur mittels N₂-gespülter Einwegspritzen und -kanülen, sodass die Zellen nicht direkt mit dem Extraktionsmittel in Berührung kamen. Im Wasserbad inkubierten die Ansätze bei 27 °C, stehend für mindestens 14 Tage oder bis eine deutliche Trübung des Mediums erkennbar war.

2.10.5 600-mL-Fed-Batch-Fermentation und *in situ*-Extraktion mit 900 mL

Isofol®12

Die Fermentation fand in Reaktoren mit einem Arbeitsvolumen von 1000 mL (Abbildung 2.10.1 C, Seite 42) statt, die jedoch durch die Zugabe des Extraktionsmittels auf 1500 mL über das angegebene Arbeitsvolumen befüllt wurden.

In der A-Bank erfolgte das Befüllen der sterilen Reaktoren mit 600 mL anoxischem YA-Medium mit 90 g/L Glucose sowie das anschließende Inokulieren mit jeweils 6 mL einer aus Sporen hergestellten, frischen Vorkultur. Nach dem Ausschleusen der beimpften und gasdicht verschlossenen Reaktoren wurden diese am Reaktorstand

angeschlossen und die Aufzeichnung gestartet. Die Fermentation fand bei 26 °C mit 200 RPM und einem Überdruck von 0,2-0,3 bar statt.

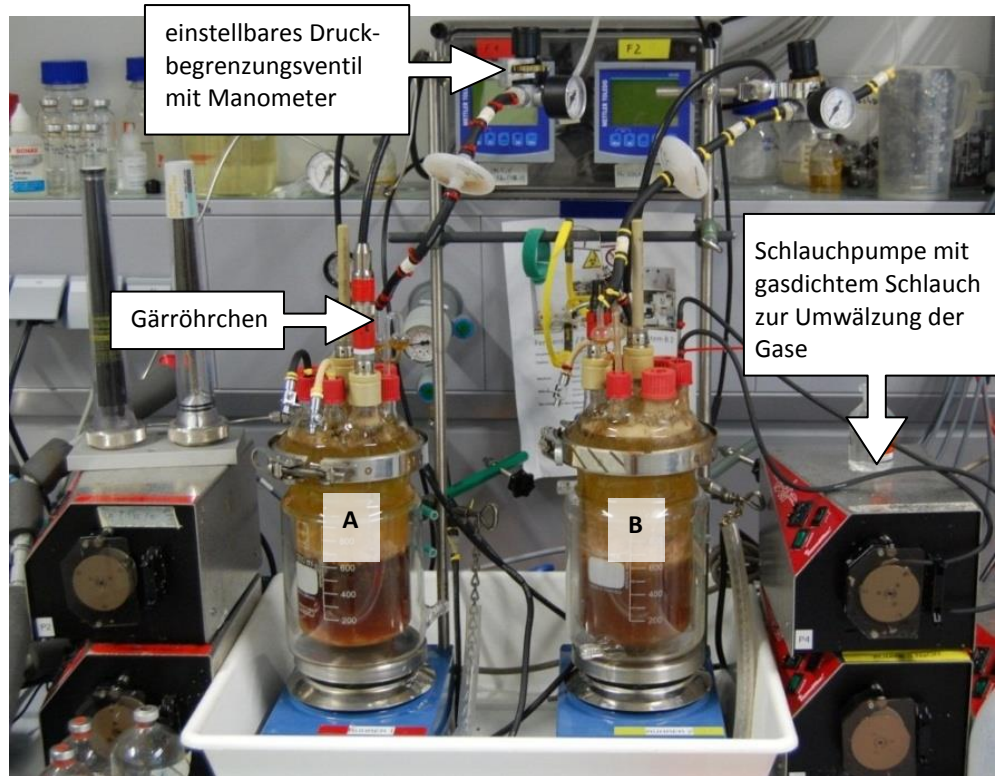


Abbildung 2.10.8: Optimisiertes Doppel-Fermentersystem mit analoger Datenaufnahme, 1000-mL-Reaktoren, (nach dem Totautoklavieren der 2-Phasen-Fermentation zur *in situ*-Extraktion, ohne (A) und mit (B) Gasraum-Gasumwälzung)

Im Gegensatz zu Reaktor **A** wurden in Reaktor **B** die Gase aus dem Gasraum über einen gasdichten Schlauch mit Hilfe einer Schlauchpumpe abgezogen und im Kreislauf über eine Begasungsfritte wieder in das Medium mit 1 mL/min eingeleitet (Abbildung 2.10.8 und Abbildung 2.10.9, Seite 53). Da das Extraktionsmittel eine Barriere zum Gasraum des Reaktors darstellte, durch die aus der wässrigen Phase Gase durch die organische Phase zum Gasraum hin abgegeben werden konnten, wurde diese Gasumwälzung installiert. Diese sollte den Verlust von Gasen (vorrangig H₂) nach der Einleitung des Extraktionsmittels minimieren, da sonst kein direkter Gasaustausch mit der wässrigen Phase möglich war.

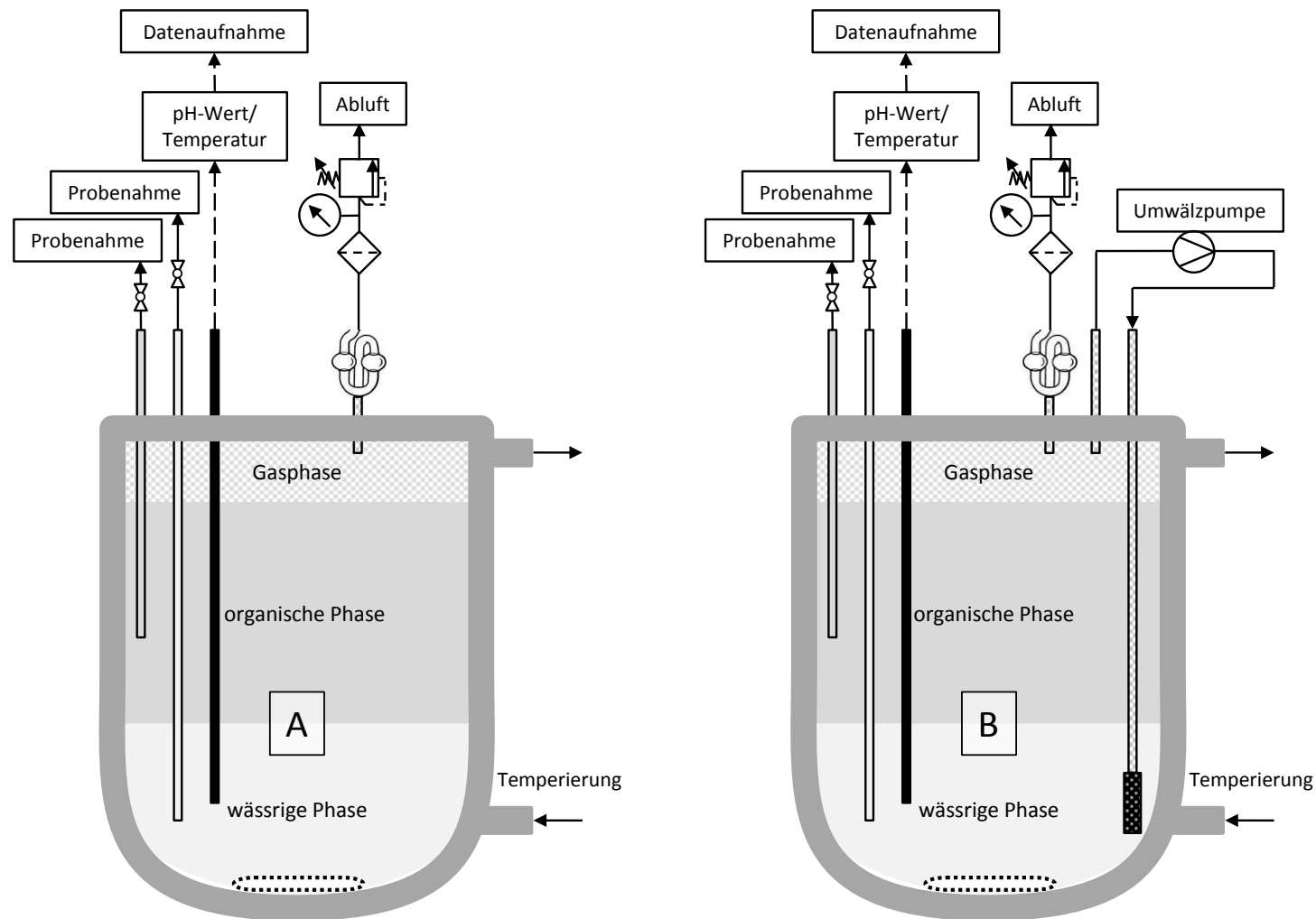


Abbildung 2.10.9: Schematische Darstellung der optimierten Reaktoren aus der 2-Phasen-Fermentation zur *in situ*-Extraktion, ohne (A) und mit (B) Gasraum-Gasumwälzung

Die Probenahme erfolgte 1-2mal pro Tag sowie vor und nach jeder Medien- oder Substratzugabe. Es erfolgte zudem eine zeitnahe Bestimmung der Produkt- und Substratkonzentrationen, um auf eintretende Limitationen durch Zugabe einer konzentrierten Glucose- oder Medium-Stammlösung reagieren zu können. Nach Erreichen von etwa 9-10 g/L Butanol in der wässrigen Phase wurden 900 mL anoxisches Isofol®12 mit Hilfe einer Schlauchpumpe in den Reaktor geleitet. Um einen O₂-Eintrag zu verhindern, erfolgte eine kontinuierliche N₂-Begasung der Schraubglasflasche mit Isofol®12 mit einem Überdruck von 0,5 bar. Über einen Metallkugelhahn konnte nun auch die organische Phase (Isofol®12) mit Hilfe einer 2-mL-Einwegspritze beprobt werden. 1 mL Isofol®12-Probe wurde in ein 1,5 mL HPLC-Glasvial überführt, verschlossen und bis zur Vermessung bei 4 °C aufbewahrt.

2.11 Analytik

2.11.1 Bestimmung der Zelldichte mit Hilfe der optischen Dichte und der

Biotrockenmasse

Um den Einfluss des Mediums auf die Messung der optischen Dichte (OD) möglichst gering zu halten musste die optimale Wellenlänge für das jeweilige Medium bestimmt werden. Nach Aufnahme eines Spektrums (400-700 nm) der Medien TYA und YA ließ sich die geringste Extinktion bei einer Wellenlänge von 535 nm feststellen, bei der alle folgenden OD-Messungen durchgeführt wurden. 100 µL der entnommenen durchgemischten Probe wurde in einer Standard-Küvette (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE) mit 0,9 %iger NaCl-Lösung, je nach Zelldichte der Kultur, im Verhältnis 1:10 oder 1:20 verdünnt. Im Anschluss erfolgte die Messung der Transmission (T_{535}) der Zellsuspension im Photometer (T80UV/VIS Spectrophotometer, PG Instruments Limited, Leicester, UK) bei 535 nm. Die OD₅₃₅ wurde durch die Software UVWin V5.0.5 (PG Instruments Limited, Leicester, UK) automatisch berechnet (Gleichung 2.11.1).

Gleichung 2.11.1
$$OD_{535} = -\log_{10} \left(\frac{T_{535}}{100} \right) \cdot f$$

T_{535} : Transmission bei 535 nm

f : Verdünnungsfaktor

Für die Bestimmung der Biotrockenmasse (BTM) sind 50 mL Probe aus Reaktorversuchen in zuvor ausgewogene 50 mL Zentrifugenröhrchen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE) überführt und bei 8800 g für 20 min abzentrifugiert worden (Biofuge Stratos, Heraeus Instruments, Osterode, DE). Der in ein neues Probengefäß überführte Überstand lagerte bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C. Das entstandene Zellpellet wurde mit 0,9 %iger NaCl-Lösung auf 50 mL aufgefüllt und resuspendiert, danach erneut abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach zwei Waschschritten trockneten die Zellpellets bei 60 °C für 24 h (UM 400, Memmert GmbH & Co KG, Schwabach, DE). Nach Abkühlen der getrockneten Zellpellets im Exsikkator erfolgte das Auswiegen der Zentrifugenröhrchen mit Zellpellet. Die BTM errechnete sich aus der Massendifferenz der ausgewogenen leeren und Zellpellet enthaltenen Zentrifugenröhrchen, bezogen auf das Probenvolumen (Gleichung 2.11.2).

Gleichung 2.11.2
$$BTM = \frac{m_{Pellet} - m_{leer}}{V}$$

BTM: Biotrockenmasse [g/L]

m_{Pellet}: Masse des Zentrifugenröhrchens mit Zellpellet [g]

m_{leer}: Masse des Zentrifugenröhrchens ohne Zellpellet [g]

V: Volumen der Zellkultur [L]

Nach Bestimmung der BTM und deren Korrelation mit der zugehörigen OD₅₃₅ (Abbildung 2.11.1) konnte, mit Hilfe der ermittelten Geradengleichung, aus der OD₅₃₅ auch die BTM in g/L berechnet werden.

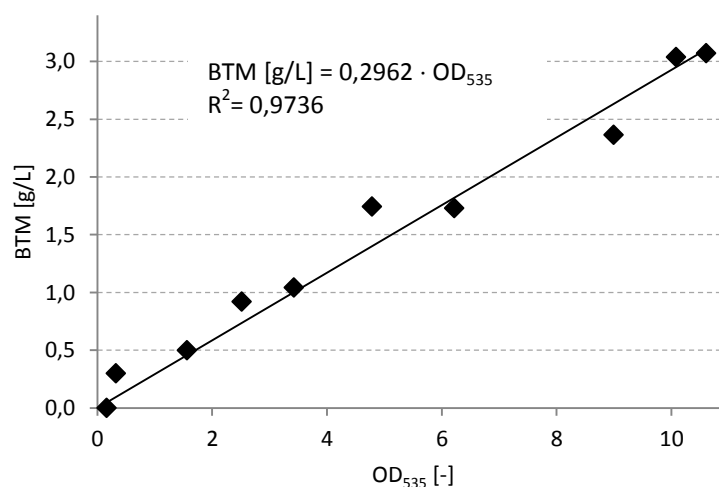


Abbildung 2.11.1: Korrelation der optischen Dichte (OD) zu Biotrockenmasse (BTM) aus Kultivierungen mit *C. spba.* in YA-Glucose-Medium

Durch Multiplizieren der gemessenen OD_{535} mit dem ermittelten Faktor 0,3 konnte die BTM errechnet werden.

2.11.2 Mikroskopische Untersuchungen

Für mikroskopische Untersuchungen der Zellen wurden 5 μ L der frisch verdünnten Proben der OD-Messung verwendet und unter dem Mikroskop (Axioplan, Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE) im Phasenkontrast-Verfahren bei 400- und 1000-facher Vergrößerung untersucht. Zur Aufnahme und Auswertung von Bildern diente eine hochauflösende Digitalkamera (X10, Olympus, DE) sowie eine Bildbearbeitungssoftware (analySIS 5.0, Soft Imaging System GmbH, Münster, DE). Zur Bestimmung der Gesamtzell- oder Sporenanzahl wurde eine Zählkammer nach Thoma verwendet und bei 400-facher Vergrößerung ausgezählt (siehe Abbildung 2.4.1, Seite 33).

Zellkolonien in Lentikats® (Immobilisate) wurden für 30 min in einer 1 %igen Carbol-Fuchsin-Lösung bei Raumtemperatur eingefärbt und danach dreimal für je 30 min mit Leitungswasser gewaschen, um die Gelmatrix der Lentikats® zu entfärben. Die Immobilisate und darin eingeschlossene Zellkolonien konnten danach mit Hilfe eines Stereomikroskops (Stemi SV8, Carl Zeiss, DE) mit Digitalkamera (SC30, Olympus, DE), untersucht werden.

2.11.3 Flüssigkeitschromatographie

Um die Proben mit einer HPLC vermessen zu können, wurden sie bei 20800 g (Centrifuge 5417 R, Eppendorf AG, Hamburg, DE) für 10 min zentrifugiert und der Überstand in neue, sterile Probengefäße überführt. In neuen 1,5 mL-Glasvials erfolgte die Verdünnung (1:10) mit 0,5 mM H₂SO₄, wonach sie verschlossen und bis zur Messung bei 4 °C aufbewahrt wurden. Der unverdünnte Überstand lagerte ebenfalls bei 4 °C. Die Vermessung der Proben erfolgte in dem in Tabelle 2.11.1 angegebenen System unter den dort aufgeführten Bedingungen.

Tabelle 2.11.1: Komponenten und Betriebsbedingungen des Knauer/Shimadzu-HPLC-Systems

| | |
|---------------|--|
| Probenaufgabe | Autosampler Basic Marathon, Spark Holland B.V., Emmen, NL |
| Probenvolumen | 20 µL Probenschleife |
| Degaser | Degasys DG 1310, Dionex, Gemeringen, DE |
| Pumpe | HPLC Pump K-1001 (0,9 mL/min; ~85 bar) Knauer, Berlin, DE |
| InterfaceBox | Knauer, Berlin, DE |
| Säulenofen | 655A-52 (80 °C), Merck/Hitachi, Darmstadt, DE |
| Trennsäulen | Vorsäule: Micro-Guard Cation H ⁺ Cartridge, BioRad (30 x 4,6 mm), CA, USA Trennsäule: Aminex HPX-87H, BioRad (300 x 7,8 mm), CA, USA |
| Detektoren | Refraktion Index (RI): K-2301, Knauer, Berlin, DE UV: SPD 10A, 2 Kanäle (bei 210 nm und 265 nm), Shimadzu, Kyoto, JP |
| Laufmittel | 5 mM H ₂ SO ₄ |

2.11.4 Gaschromatographie

2.11.4.1 Analyse der Gase im Gasraum (H₂, CO₂, N₂)

Jeweils 20 mL Gasprobe wurde mit Hilfe einer gasdichten Omnifix®Luer-Lock-Spritze und Sterican®Kanüle (B. Braun Melsungen AG, DE) aus dem Gasraum der 100-mL-Kulturvials in vakuumierte 20-mL-Glasvials (Machery Nagel, Düren, DE) mit GC-Butylgummistopfen überführt. Diese „GC“-Vials konnten durch einen Headspace-Autosampler (HSS86.50 DANI, Cologno Monzese, IT) aufgenommen und beprobt werden. Vor der Probenaufgabe in den GC wurde jedes Probenvial im Autosampler für eine Minute auf 80 °C temperiert. Die Vermessung erfolgte unter den in Tabelle 2.11.2 angegebenen Bedingungen.

Material und Methoden

Tabelle 2.11.2: Komponenten und Betriebsbedingungen des Shimadzu GC-14B zur Vermessung der Gase

| | |
|---------------------|---|
| Probenaufgabe | Autosampler DANI HSS 86.50 (80 °C), IT |
| Probenvolumen | 1 mL |
| Ofentemperatur | 80 °C |
| Trennsäulen | Vorsäule: PorapakQS(80/100 mesh) Stahl: 3m x 3mm Säule 1: PorapakQS(80/100 mesh) Stahl: 3m x 3mm Säule 2: Molsieb 5 Å (60/80 mesh) Stahl: 4,5m x 3mm |
| Säulenschaltung | 12 Portventil geschaltet nach 3 min und 10 min |
| Detektoren | Thermal Conductivity Detector (TCD) (100 °C) Flame Ionization Detector (FID) (320 °C) (Brenngas: H ₂) Electron Capture Detector (ECD) (320 °C) ⁶³ Ni |
| Trärgas | Ar |
| Make-up-Gas für ECD | N ₂ |
| Brenngas für FID | H ₂ |
| Make-Up-Gas für FID | N ₂ |

2.11.4.2 Analyse der Fermentationsprodukte Aceton, Butanol, Ethanol in Isofol®12

Alle Standards für Aceton, Butanol und Ethanol in Isofol®12 wurden auf einer Feinwaage (Analytic A200S, Sartorius Göttingen, DE) eingewogen und entsprechend mit Isofol®12 gravimetrisch verdünnt. Jeweils 1 mL Isofol®12-Probe aus dem 2-Phasenreaktor wurde mit 2-mL-Einmalspritzen (Injekt®Solo, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, DE) aus dem Reaktor entnommen, in 1,5-mL-Glasvials überführt, verschlossen und bis zur Vermessung bei 4 °C gelagert. Vor der Vermessung in der GC 14A ist die Probe im Verhältnis 1:10 mit Isofol®12 gravimetrisch in neuen 1,5-mL-Glasvials verdünnt worden.

Material und Methoden

Tabelle 2.11.3: Komponenten und Betriebsbedingungen des Shimadzu GC-14A zur Analyse der Endprodukte des ABE-Prozesses in Isofol®12

| | |
|--------------------|--|
| Probenaufgabe | Autosampler AOC 20i Auto Injector, Shimadzu, Kyoto, JP |
| Probenvolumen | 1µL |
| Inject-Temperatur | 350 °C |
| Liner | SGE Focus Liner™, vorgepackt mit Glaswolle |
| Splitrate | 1:10 |
| Trennsäule | ZB WAXplus(30m x 0,53mm; Fd: 1µm) max. 235 °C, Zebron, Phenomenex, CA, USA |
| Säulenfluss | 11 mL/min |
| Kopfdruck | 0,6 kg/m ² |
| Säulendruck | 0,6 bar |
| Trärgas | He |
| Temperaturprogramm | 40 °C (3 min) mit 20 °C/min auf 235 °C (8 min) |
| Detektor | FID (Brenngas: H ₂) |

Die Analytik musste für die Vermessung der Endprodukte Aceton, Butanol und Ethanol in Isofol®12 optimiert werden. Dies bezog die Optimierung der Parameter Säulenfluss, Splitrate, Temperaturprogramm sowie, aufgrund der höheren Viskosität von Isofol®12, die Injektionsmethode mit ein. Mit der in Tabelle 2.11.3 angegebenen Methode konnten die Endprodukte eindeutig identifiziert und quantifiziert werden. Besonders durch Optimierung der Injektionsmethode konnte eine Reproduzierbarkeit, ermittelt als Variationskoeffizient (C_V), von 1,1 erreicht werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Testversuche in Mikrotiterplatten

Vorversuche im Mikrolitermaßstab mit 96-Well-Mikrotiterplatten (MTP) sollten schnelle Ergebnisse liefern, um Tendenzen für die Optimierung in Reaktorversuchen zu erkennen.

Tabelle 3.1.1: Vor- und Nachteile von Versuchen in Mikrotiterplatten mit *C. spba*.

| Vorteile | Nachteile |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • geringer Materialaufwand • zeitgleiche Untersuchung vieler verschiedener Parameter | <ul style="list-style-type: none"> • gebildete Gasblasen stören OD-Messung • Verschlechterung der Inkubationsbedingungen durch notwendiges Schütteln vor OD-Messung • Kreuzkontamination • Lösungsmittel und Gase entweichen durch Kunststoff der MTPs |

Die Inkubation wurde bei 30 °C unter anoxischen Bedingungen in einem temperierbaren und mit N₂ begasten MTP-Plattenreader durchgeführt. Probleme traten jedoch durch die starke Gasbildung während der Inkubation auf. Es war nicht möglich die OD₅₃₅ über die Zeit aufzunehmen, da Gasblasen in den einzelnen Wells die Ergebnisse verfälschten und es sogar zu Kreuzkontaminationen zwischen den mit Abdeckfolie verschlossenen Wells kam. Die Endprodukte Aceton, Butanol und Ethanol sind zudem flüchtige Lösungsmittel und entwichen oder diffundierten während der Inkubation durch das mit Abdeckfolie und Deckel verschlossene System MTP. Das System MTP konnte aus den oben genannten Gründen leider nicht genutzt werden. Als kleinster Maßstab diente im Folgenden das gasdichte System der Vials mit Butylgummiseptum in verschiedenen Volumina.

3.2 Optimierung des Start-pH-Wertes

Für die Ermittlung des optimalen Start-pH-Wertes wurde ein Inkubationsversuch in Vials mit TYA-Medium und 50 g/L Glucose bei einer Temperatur von 30 °C durchgeführt. Die pH-Werte der Ansätze wurden in der A-Bank mit NaOH eingestellt. Die täglich entnommenen Proben wurden auf gelöste Produktkonzentrationen, OD₅₃₅ und pH-Werte untersucht.

Ergebnisse und Diskussion

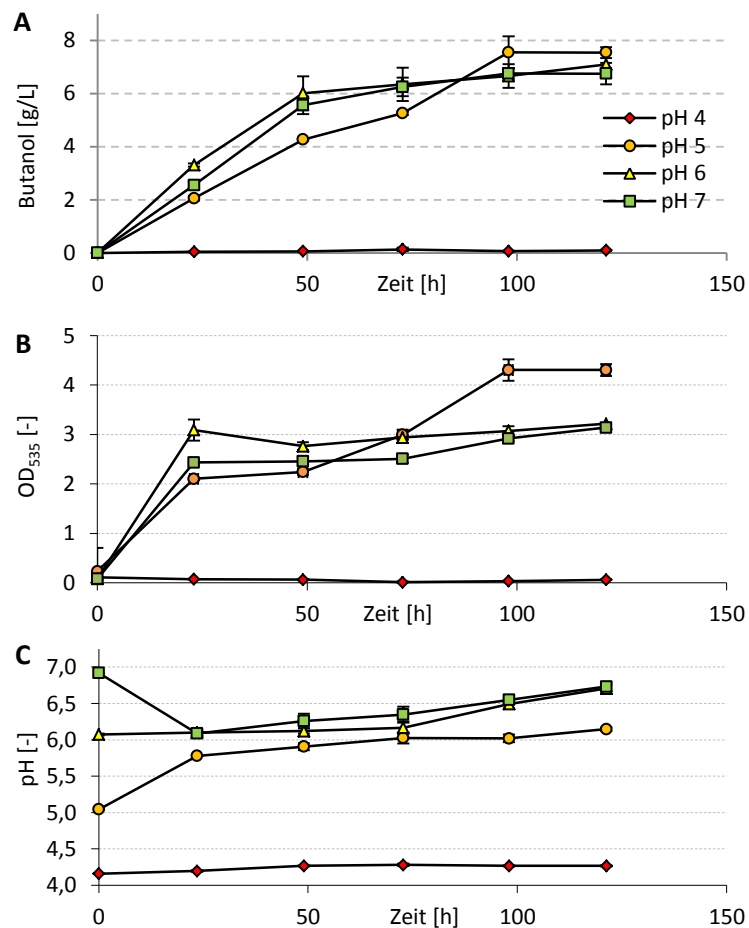


Abbildung 3.2.1: Butanolkonzentration (A), optische Dichte (B) und pH-Werte (C) über die Zeit im Inkubationsversuch mit *C. spba.* in 50-mL-Vials und TYA-Medium mit 50 g/L Glucose bei 30 °C

Es konnte nahezu keine Bildung von Butanol (Abbildung 3.2.1 A) bei einem Start-pH-Wert von 4,2 festgestellt werden. Mit einem Start-pH-Wert von 5 wurde in den Vialansätzen die höchste Butanol-Endkonzentration von 7,5 g/L erreicht. Die Ansätze mit pH-Werten von 6 und 7 begannen im Vergleich zu pH-Wert 5 mit leicht erhöhten Butanol-Bildungsraten. Nach 49 h nahmen die Produktivitäten ab und erreichten nach 72 h mit 6,75 g/L und 7,05 g/L Butanol nicht die Endkonzentrationen, verglichen mit denen bei einem Start-pH-Wert von 5.

Die OD-Werte (Abbildung 3.2.1 B) spiegeln den Verlauf der Butanolkonzentrationen wider. Mit einem pH-Wert von 4 war kaum Zellwachstum zu erkennen. Der auf den pH-Wert 5 eingestellte Ansatz zeigte, im Vergleich zu den pH-Werten 6 und 7, ein leicht verzögertes Wachstum, holte aber nach 50 h auf und erreichte mit einem Wert von 4,3 die höchste OD₅₃₅ in diesem Versuch. Bei einem pH-Wert von 6 wurde nach 23 h eine OD₅₃₅ von 3 erreicht, welche nach 121 h auf 3,2 anstieg. Mit einem Start-pH-

Wert von 7 konnte nach 23 h eine OD_{535} von 2,4 ermittelt werden, die nach 121 h weiter auf 3,1 anstieg.

Betrachtet man die pH-Verläufe (Abbildung 3.2.1 C) wird deutlich, dass sich bei den Ansätzen mit pH-Werten von 5, 6 und 7 innerhalb der ersten 23,5 h ein pH-Wert zwischen 6 und 6,3 einstellte und erst nach 75-100 h auf pH-Werte zwischen 6,1 und 6,7 anstieg. Mit einem Start-pH-Wert von 4,2 veränderten sich pH-Wert und Zelldichte kaum und verblieben auf niedrigem Niveau. Ein pH-Wert zwischen 5 und 6 scheint für eine möglichst hohe Butanol-Endkonzentration optimal zu sein. Allerdings ließ sich auch bei pH-Wert 7 kein signifikanter Nachteil für die Butanolbildung erkennen. Bei einem Start-pH-Wert von 4 konnten Zellwachstum oder Produktbildung praktisch nicht beobachtet werden (Abbildung 3.2.1 A, B).

Das Umschalten des Stoffwechsels von der acidogenen auf die solventogene Phase ist unter anderem pH-Wert abhängig [GRUPE & GOTTSCHALK 1992; MILLAT ET AL. 2013] und setzt bei pH-Werten unterhalb von 5 ein. Liegt der pH-Wert zu tief muss die Zelle zu viel Energie aufwenden, um Protonen aus der Zelle zu pumpen und einen Protonengradienten aufrecht zu erhalten (siehe 1.6, Seite 16). Wird zu viel Energie (ATP) verbraucht schafft es die Zelle nicht mehr die Säuren in Alkohole umzuwandeln [RIEBELING ET AL. 1975].

3.3 Medienoptimierung und Anpassung der Fermentationsparameter

3.3.1 Einfluss von Trypton, Be- und Entgasung oder Durchmischung auf die Produktbildung

Ein primäres Anliegen des Projektes war es die Kosten im Fermentationsprozess durch günstigere Medienzusammensetzungen und Substrate zu reduzieren. Der Einfluss von Trypton wurde daher in Vial- und Reaktorversuchen untersucht.

3.3.1.1 Einfluss von Trypton im Vialversuch

Dieser Vialversuch sollte klarstellen ob der Einsatz von Trypton essentiell für den ABE-Prozess ist. Dazu sind die Medien TYA und YA mit 50 g/L Glucose für die Inkubation von *C. spba.* als Standkulturen bei 30 °C genutzt worden.

Ergebnisse und Diskussion

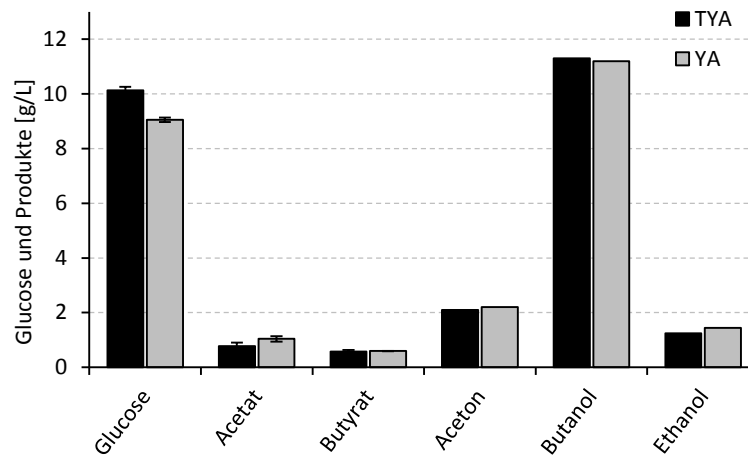


Abbildung 3.3.1: Endkonzentrationen nach 150 h in 50-mL-Vials mit 30 mL TYA- oder YA-Medium und 50 g/L Glucose als 3-fach-Ansatz, inkubiert bei 30 °C, Start-pH-Wert: 6,3

Bei den Endprodukten konnten in TYA- und YA-Medium vergleichbare Endkonzentrationen von 2,1-2,2 g/L Aceton, 11,2-11,3 g/L Butanol und 1,2-1,4 g/L Ethanol (Abbildung 3.3.1) ermittelt werden. Ohne Trypton wurde 1,1 g/L mehr Glucose verbraucht. Zwischen den Ansätzen mit und ohne Trypton waren, im Hinblick auf die Endprodukte keine nennenswerten Unterschiede zu erkennen. Im Vialansatz hatte Trypton keinen erkennbaren Effekt auf die Produktbildung und scheint unter diesen Bedingungen kein essentieller Medienbestandteil zu sein.

3.3.1.2 Einfluss von Trypton im Reaktorversuch

Im nächsten Experiment wurde der Einfluss von Trypton unter Reaktorbedingungen untersucht. In einem Parallel-Fermentersystem mit 500-mL-Reaktoren wurden zwei Ansätze mit jeweils 400 mL TYA- oder YA-Medium und 50 g/L Glucose unter N₂-Begasung und Rührung (500 RPM) bei 30 °C inkubiert.

Ergebnisse und Diskussion

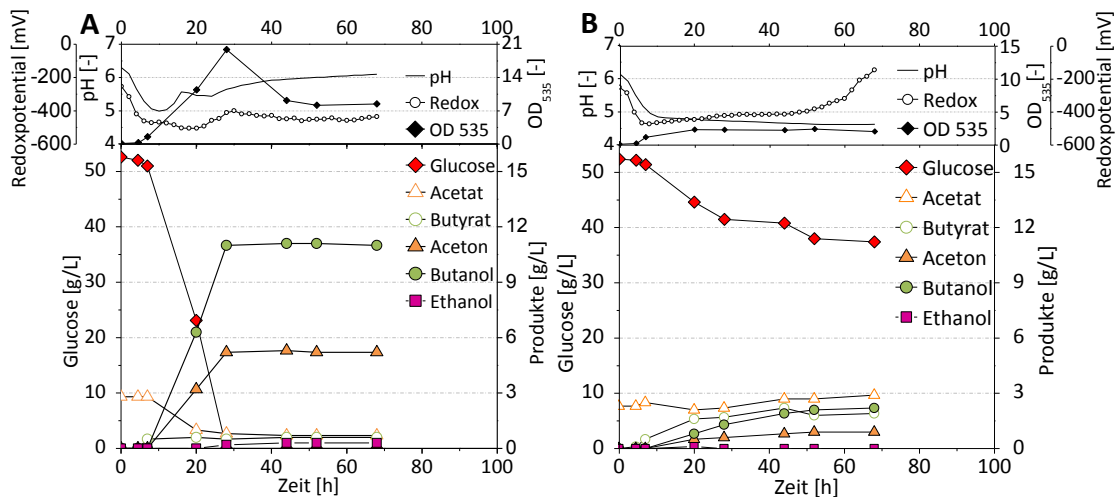


Abbildung 3.3.2: Zeitliche Verläufe der Substrat- und Produktkonzentrationen, des pH-Wertes und der OD_{535} einer Batch-Fermentation mit *C. spba.* in 500-mL-Reaktoren mit 400 mL TYA- (A) oder YA-Medium (B) und 50 g/L Glucose als Substrat. Inkubation bei 30 °C mit N_2 -Begasung und Rührung (500 RPM), Start-pH-Wert: 6,3 (ungeregelt)

Im Reaktor mit TYA-Medium (Abbildung 3.3.2 A) erfolgte eine vollständige Umsetzung von Glucose und Acetat zu 11 g/L Butanol und 5,2 g/L Aceton. Acetat und Butyrat waren nach 44 h in geringen Konzentrationen mit 0,7 g/L und 0,6 g/L in Lösung nachweisbar. Die maximale Produktivität für Butanol betrug von 20-28 h $0,58 \text{ g(L}\cdot\text{h)}^{-1}$. Der pH-Wert fiel innerhalb der ersten 10 h von 6,3 auf 5 ab und stieg mit eintreten der solventogenen Phase nach 16 h auf 5,6 an, sank wieder auf 5,4 ab und erreichte nach 65 h 6,1. Mit Erreichen der maximalen Butanolkonzentration konnte auch die maximale OD_{535} mit einem Wert von 20 ermittelt werden, welche nach 52 h bis auf 8,2 abfiel. Ohne Trypton wurden nur etwa 15 g/L Glucose verbraucht (Abbildung 3.3.2 B). Es konnten nur geringe Konzentrationen an Butanol (2,2 g/L) und Aceton (0,9 g/L) aber vergleichsweise hohe Konzentrationen der Säuren Butyrat (1,9 g/L) und Acetat (2,9 g/L) gemessen werden. Der pH-Wert fiel innerhalb von 10 h unter 5 stieg aber, im Gegensatz zum Ansatz mit Trypton, nicht mehr an, sondern sank weiter auf 4,6 ab. Die OD_{535} erreichte maximal 2,4 und lag damit weit unter der des Vergleichsreaktors mit TYA-Medium. Die Ethanolkonzentration kam mit Trypton auf 0,3 g/L und ohne auf 0,1 g/L, wurde aber aufgrund des geringen Anteils nicht weiter betrachtet.

Der Vergleich beider Fermentationen (Abbildung 3.3.2) zeigte deutliche Unterschiede im Verlauf der ermittelten Konzentrationen und Parameter. Trypton hatte im Reaktor, unter den oben genannten Bedingungen einen positiven Effekt auf Substratumsetzung und Produktbildung. Um sich vor Übersäuerung durch das gebildete Acetat und

Ergebnisse und Diskussion

Butyrat zu schützen, geht *C. spba.* von der acidogenen Phase in die solventogene Phase über [MILLAT ET AL. 2013]. Ohne Trypton konnten aber die gebildeten Säuren, unter den oben genannten Bedingungen, nur unzureichend zu Lösungsmitteln umgewandelt werden, wodurch der pH-Wert auf 4,6 sank, jedoch nicht mehr anstieg und das Zellwachstum zum Erliegen kam.

Parallel zum Reaktorversuch wurden mit denselben Zellen Kontrollen in 20-mL-Vials mit einem Arbeitsvolumen von 10 mL TYA- bzw. YA-Medium und 20 g/L Glucose, stehend bei 30 °C inkubiert.

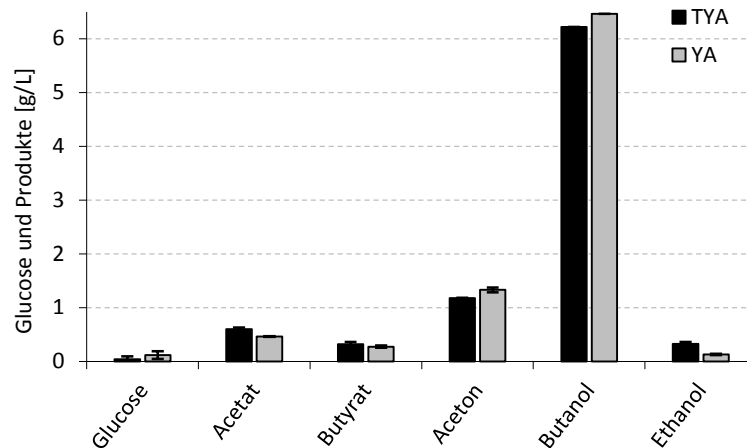


Abbildung 3.3.3: Endkonzentrationen nach 120 h in 20-mL-Vials mit 10 mL TYA- oder YA-Medium und 20 g/L Glucose als Doppelansatz, mit identischem Inokulum zum Versuch in Abbildung 3.3.2, inkubiert bei 30 °C, Start-pH-Wert: 6,3

Im TYA-Medium waren nach 120 h Inkubation 1,2 g/L Aceton und 6,2 g/L Butanol nachweisbar. Ohne Trypton konnten 1,3 g/L Aceton und 6,5 g/L Butanol gebildet werden. Mit Trypton im Medium waren die Endkonzentrationen von Säuren und Ethanol in geringem Maße höher als ohne Trypton. Die Ergebnisse der Vialversuche (Abbildung 3.3.3, Abbildung 3.3.1) zeigten damit vergleichbare Produkt-Endkonzentrationen in TYA- und YA-Ansätzen, was aber im Reaktorversuch (Abbildung 3.3.2) nicht beobachtet werden konnte.

Dies warf folgende Fragen auf:

- (1) Welche der in folgender Tabelle 3.3.1 aufgeführten Parameter beeinflussen die Produktbildung, speziell bei Verwendung von Medium ohne Trypton?
- (2) Unter welchen Bedingungen kann in einer Fermentation im Reaktor, ohne Trypton eine Butanolkonzentration von über 10 g/L erreicht werden?

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3.3.1: Unterschiede zwischen den Systemen Vial und Reaktor

| Vial | Reaktor |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> kein Gasaustausch entstehen hoher Drücke (bis 4 Bar) keine Durchmischung geringes Volumen | <ul style="list-style-type: none"> Be- und Entgasung möglich kein Überdruck Durchmischung größeres Volumen |

Im Metabolismus solventogener Clostridien werden Reduktionsäquivalente ($\text{NADH(P)} + \text{H}^+$) in der Glycolyse sowie bei der Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA gebildet und reichern sich in der Zelle an. Das Bakterium kann bei zu hoher $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ -Konzentration und einem geringen H_2 -Partialdruck mit Hilfe von Ferredoxin-Oxidoreduktasen und Hydrogenasen $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ zu NAD(P)^+ und molekularem H_2 umwandeln, welcher an die Umwelt abgegeben wird [MOLLAH & STUCKEY 1992]. NAD(P)^+ liegt nun wieder als Oxidationsmittel in der Glycolyse vor.

In der acidogenen Phase gewinnt die Zelle Energie in Form von ATP mit der Bildung von Säuren (Acetat und Butyrat), was allerdings zu einem Absinken des pH-Wertes führt. Die Zelle kann dem entgegen wirken indem ihr Stoffwechsel in die solventogene Phase umschaltet, um die Säuren mithilfe von $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ zu Alkoholen (Ethanol und Butanol) zu reduzieren [NAKAYAMA ET AL. 2008]. Wurde bereits ein Großteil des $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ irreversibel zu NAD(P)^+ und H_2 umgewandelt stehen nicht mehr genügend Reduktionsäquivalente für die Reduktion der Säuren zur Verfügung und der pH-Wert fällt unter einen kritischen Wert. Um diesen Effekt zu reduzieren, sollte das Medium möglichst mit molekularem H_2 gesättigt sein.

DOREMUS ET AL. [1985] konnte zeigen, dass die Butanolbildung in einer Kultur mit *C. acetobutylicum* mit steigender Rührgeschwindigkeit abnimmt und die H_2 -Bildung zunimmt. Eine Durchmischung scheint die Umwandlung der Reduktionsäquivalente zu H_2 zu begünstigen. BROUSSEAU ET AL. [1986] zeigte, dass mit *C. spba.* bei ungehinderter Freisetzung der Gase fast ausschließlich H_2 , CO_2 und Ethanol gebildet werden. Bei veränderter Gasfreisetzung wurden Aceton, Butanol und Ethanol gebildet.

Da H_2 in Form von $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$ eine wesentliche Rolle bei der Hydrierung der Säuren Acetat und Butyrat zu den Alkoholen Ethanol und Butanol spielt, sollte dessen Freisetzung, z.B. durch anreichern der Kulturbrühe mit H_2 , verringert werden. Durch

Verringerung der Durchmischung, Begasung der Kultur mit H_2 oder durch Anlegen eines Überdrucks kann dies erreicht werden. Diese Parameter wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf die Produktbildung in folgenden Reaktor- und Vialversuchen untersucht.

3.3.1.3 Zusammensetzung der Gasphase im Vialversuch

Um herauszufinden wie sich die Gasphase anteilig zusammensetzt und über die Zeit verändert, wurde die Gasphase während eines Inkubationsversuches untersucht (Abbildung 6.2.1, Seite 124). *C. spba.* inkubierte in TYA-Medium mit 40 g/L Glucose bei 30 °C. Die Gasphase wurde während des Inkubationsversuches beprobt und in einer GC vermessen.

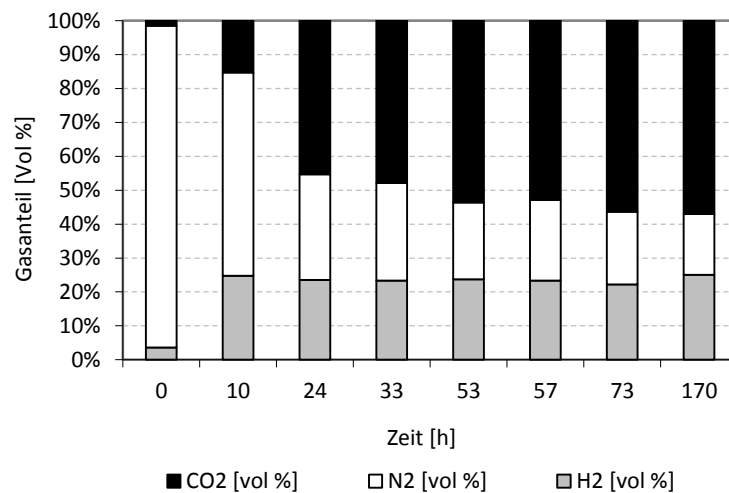


Abbildung 3.3.4: Verteilung prozentualer Anteile der Gase im Gasraum N_2 , CO_2 und H_2 über die Zeit im Vialversuch mit TYA-Medium und 40 g/L Glucose. Die 40 mL 3-fach-Ansätze wurden in 100-mL-Vials bei 30 °C inkubiert, Start-pH-Wert: 6,5.

Die prozentuale Darstellung der Gasanteile in der Gasphase veranschaulicht wie sich die Gaszusammensetzung in der Kultur über die Zeit verändert hat (Abbildung 3.3.4). Die Gasphase setzte sich hauptsächlich aus N_2 , CO_2 und H_2 zusammen.

Konzentrationen anderer Gase waren für eine Auswertung zu gering und wurden deshalb nicht weiter aufgeführt. Nach den ersten 10 h zeigte sich ein erhöhter H_2 -Anteil von etwa 25 %, der sich im weiteren Verlauf nicht mehr wesentlich veränderte. Der Anteil an CO_2 betrug zum selben Zeitpunkt ca. 15 % und stieg mit andauernder Inkubationszeit (53 h) auf etwa 55 % in der Gasphase an. Der N_2 -Anteil verringerte sich zu Gunsten der Gase CO_2 und H_2 auf knapp 20 %.

3.3.1.4 Einfluss von Durchmischung und Gasfreisetzung in Abhängigkeit von Trypton

Aus Versuch 3.3.1.2 auf Seite 63 ging hervor, dass im Reaktoransatz ohne Trypton nur geringe Produktkonzentrationen erreicht werden konnten. In Vialversuchen (Abbildung 3.3.1, Seite 63; Abbildung 3.3.3, Seite 65) wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede, bezüglich der Produkt-Endkonzentrationen zwischen TYA- und YA-Medium beobachtet. Wie zuvor beschrieben kann die Verfügbarkeit der Reduktionsäquivalente, in Form von $\text{NAD(P)H} + \text{H}^+$, entscheidend für die Bildung der Lösungsmittel sein. Steht dies dem Stoffwechsel nicht mehr zur Verfügung, weil es als H_2 in die Gasphase übergegangen ist, können auch keine Lösungsmittel gebildet werden.

Im folgenden Versuch wurden die Parameter Rührung und Entweichen der Gase in Zusammenhang mit Trypton untersucht. Mit 60 mL TYA- oder YA-Glucose-Medium inkubierte *C. spba.* für 114 h in 100-mL-Schraubglasflaschen bei 30 °C. Ein 3-fach-Ansatz wurde gerührt, wobei die Gase über Gärröhrchen entweichen konnten (offen). Der zweite Ansatz inkubierte gerührt ohne Gasfreisetzung (verschlossen). Ein dritter Ansatz wurde ungerührt (stehend) und offen inkubiert. Der vierte 3-fach-Ansatz inkubierte stehend und verschlossen. In verschlossen Ansätzen konnten sich Überdrücke von bis zu 4 bar in der Schraubglasflasche aufbauen.

Ergebnisse und Diskussion

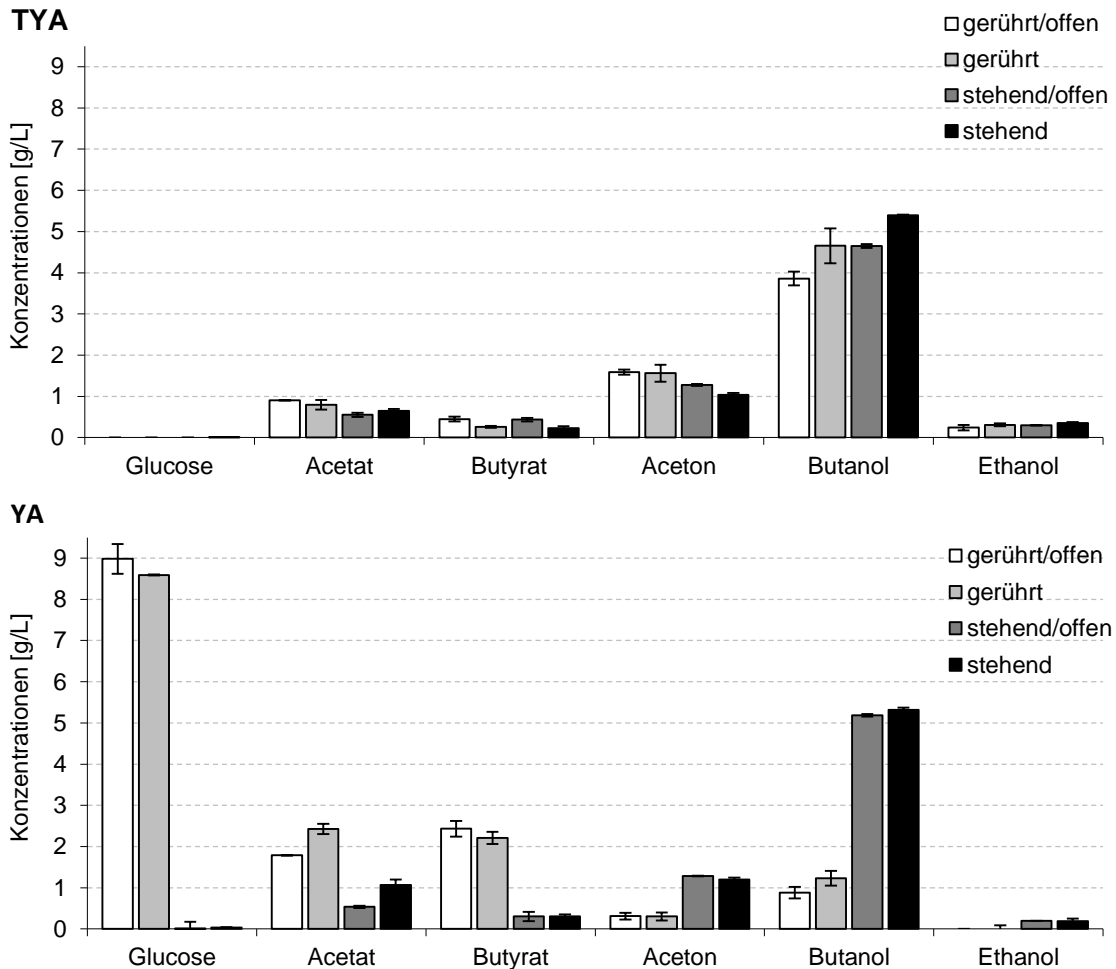


Abbildung 3.3.5: Endkonzentrationen von *C. spba.* in gasdichten 100 mL Schraubflaschen mit 60 mL TYA- bzw. YA-Medium und 20 g/L Glucose bei 30 °C nach 114 h Inkubation; stehend (0 RPM), gerührt (250 RPM), offen (über Gärröhrchen), Start-pH-Werte TYA: 6,8; YA: 6,7

Mit TYA-Medium wurden die vorgelegten 20 g/L Glucose unter allen untersuchten Bedingungen verbraucht (Abbildung 3.3.5). Die durchmischten Ansätze zeigten höhere Acetat- (0,8-0,9 g/L) und Acetonkonzentrationen (1,6 g/L) im Vergleich zu den Standkulturen mit 0,6 g/L Acetat sowie 1 g/L bzw. 1,3 g/L Aceton. Der Ansatz „gerührt/offen“ erreichte eine Butanolkonzentration von 3,9 g/L. Die Ansätze „gerührt“ und „stehend/offen“ enthielten jeweils 4,7 g/L Butanol. Die Standkultur erreichte mit 5,4 g/L den Höchstwert. In den offenen Ansätzen konnten um 0,2 g/L höhere Butyratkonzentrationen ermittelt werden. Die Ethanolkonzentrationen ließen keine signifikanten Unterschiede erkennen.

In YA-Medium wurde die Glucose nur in den stehend inkubierten Kulturen vollständig verbraucht, was sich auch auf die Konzentrationen der Endprodukte auswirkte. Acetat war im Ansatz „gerührt/offen“ mit 1,8 g/L und im gerührten Ansatz mit 2,4 g/L

nachweisbar. In den verschlossenen Ansätzen konnten weniger Gase aus der Kultur entweichen, was unter anderem den weiteren Abbau von Acetat zu Aceton unter CO₂-Bildung hemmen könnte. Allerdings war der Effekt in den gerührten Kulturen an den ohnehin schon niedrigen Acetonkonzentrationen (offen: 0,31 g/L; verschlossen: 0,30 g/L) nur schwer zu erkennen und nicht signifikant. Der Einfluss der Gasfreisetzung zeigte sich auch in den Standkulturen, wobei Acetat mit 0,5 g/L (offen) und 1,1 g/L (verschlossen) gemessen wurden. Aceton lag mit 1,3 g/L (offen) und 1,2 g/L (verschlossen) vor. In den Rührkulturen befanden sich in offenen Ansätzen 2,4 g/L und in verschlossenen Ansätzen 2,2 g/L Butyrat in Lösung. Die Standkulturen zeigten keine signifikanten Unterschiede in den Butyratkonzentrationen zwischen offenen (0,30 g/L) und verschlossenen Kulturen (0,31 g/L). Butanol konnte in den gerührten Ansätzen mit 0,9 g/L und 1,2 g/L nachgewiesen werden. Die Standkulturen bildeten 5,2 g/L und 5,3 g/L Butanol sowie jeweils 0,2 g/L Ethanol. Ohne Trypton konnte ein verstärkter Einfluss der Rührung auf die Produktbildung beobachtet werden.

Ohne Rührung und/oder Gasfreisetzung wurden höhere Alkoholkonzentrationen gebildet. Die Effekte verstärkten sich ohne Trypton, wobei die Rührung den größten Einfluss auf die Produktbildung der Kulturen hatte. Ohne Trypton konnten nur in den Standkulturen Butanolkonzentrationen von über 5 g/L erzielt werden, was mit den höchsten Konzentrationen der tryptonhaltigen Ansätze vergleichbar war. Es zeigte sich, dass die Durchmischung einen größeren Einfluss auf die Produktbildung hat als das Entweichen der Gase.

3.3.1.5 Einfluss der Durchmischungsart

Um abzuklären ob ein Unterschied zwischen einer gerührten oder einer geschüttelten Kultur besteht, wurde im folgenden Experiment der Einfluss der Durchmischungsart auf die Produktbildung untersucht. Dafür inkubierte *C. spba.* in Schraubglasflaschen als gerührte, geschüttelte oder stehende Kultur in YA-Glucose-Medium bei 30 °C. Die entstandenen Gase konnten über Gärverschlüsse entweichen, sodass sich kein Überdruck entwickeln konnte. Nachdem keine weitere Veränderung der Substrat- und Produktkonzentrationen zu beobachten war, erfolgte nach 168 h die Endprobenahme.

Ergebnisse und Diskussion

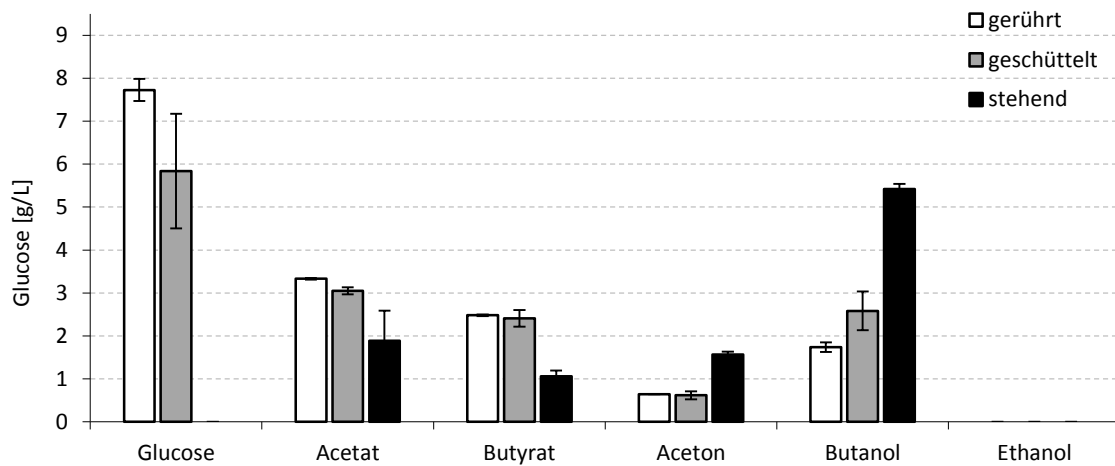


Abbildung 3.3.6: Endkonzentrationen von *C. spba.* in gasdichten 100 mL Schraubflaschen mit 60 mL YA-Medium und 20 g/L Glucose bei 30 °C nach 168 h Inkubation, stehend (0 RPM), geschüttelt (150 RPM), gerührt (150 RPM), Gasfreisetzung über Gärröhrchen, Start-pH-Wert: 6,7

In Abbildung 3.3.6 ist zu erkennen, dass die Produktkonzentrationen von Aceton und Butanol in Standkultur mit 1,6 g/L und 5,4 g/L mehr als doppelt so hoch waren wie die beiden durchmischten Ansätze mit maximal 0,6 g/L Aceton und 2,6 g/L Butanol (Schüttelkultur). In geschüttelter und gerührter Kultur wurden erhöhte Konzentrationen an Acetat mit 3,0 g/L und 3,3 g/L oder Butyrat mit 2,4 g/L und 2,5 g/L gemessen. Eine Ethanolbildung konnte in keinem der Ansätze beobachtet werden.

Auch hier zeigen die Ergebnisse den negativen Einfluss der Durchmischung auf die Endproduktbildung der Kulturen. Bei gleicher Drehzahl hatte Rühren, verglichen mit Schüttel, einen etwas stärkeren Einfluss auf die Produktbildung.

Die Versuchsergebnisse in Abbildung 3.3.2, Seite 64, Abbildung 3.3.5, Seite 69, Abbildung 3.3.6 gaben Hinweise auf eine unzureichende Hydrierung der Säuren zu den Alkoholen in durchmischten Ansätzen. Als Folge einer Ansäuerung des Mediums durch die gebildeten Säuren kam es früher zum Erliegen des Metabolismus. Das Produktspektrum hatte sich in den durchmischten Kulturen von Butanol/Ethanol zu H_2 verschoben. Da aber eine Rührung im Reaktor für eine optimale Substratverteilung und Temperierung nötig war, konnte sie lediglich auf ein Minimum reduziert werden.

Die gewonnenen Erkenntnisse wurden im Folgenden durch Fed-Batch-Versuche in Reaktoren mit YA-Glucose-Medium überprüft. Darüber hinaus wurde untersucht, ob ein Verhindern der Gasbildung durch Maßnahmen wie Verminderung der Rührung

oder Anlegen eines Überdrucks im Reaktor [DOREMUS ET AL. 1985; BROSSÉAU ET AL. 1986; YU ET AL. 2011] zu einer Verbesserung der Produktbildung führt.

3.3.2 Einfluss der H₂-Begasung im Reaktor

Für eine Anreicherung des Mediums und des Gasraum-Volumens mit H₂ wurde ein Reaktor mit H₂ begast (1 mL/min), um eine Bildung von molekularem H₂ in der Kultur mit *C. spba.* zu reduzieren. Der Vergleichsreaktor verblieb als Kontrolle ohne Begasung. Beide Reaktoren wurden mit 200 RPM gerührt und bei 30 °C inkubiert. Entstandene Gase konnten, unter Gewährleistung anoxischer Bedingungen, über Gärverschlüsse entweichen. In Reaktor **A** (mit H₂-Begasung) erfolgte nach 42,5 h, 50 h und 66,5 h die Zugabe von Glucose (Abbildung 3.3.7). In Reaktor **B** (ohne Begasung) wurde einmalig nach 42,5 h Glucose zugegeben.

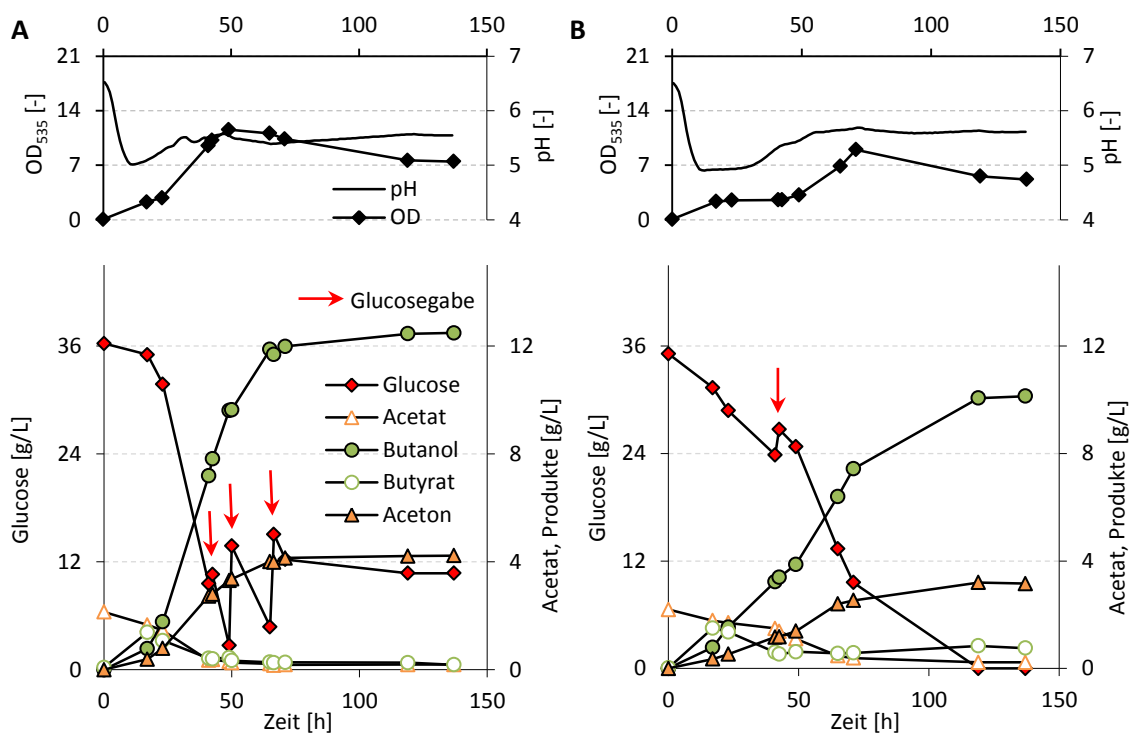


Abbildung 3.3.7: Konzentrationsverläufe der Substrate und Produkte sowie OD₅₃₅ und pH-Werte einer Fed-Batch-Parallelfertmentation mit *C. spba.* in 500-mL-Glasreaktoren mit 400 mL YA-Glucose-Medium, 30 °C Inkubationstemperatur, 200 RPM Rührung, Reaktor mit H₂-Begasung (A) oder ohne Begasung (B) Start-pH-Wert: 6,5 (ungeregelt)

Im Reaktor mit H₂-Begasung (Abbildung 3.3.7 A) konnten nach 71 h knapp 12 g/L Butanol und 4,1 g/L Aceton ermittelt werden. Die gelöste Acetatkonzentration sank in 50 h von 2,1 auf 0,2 g/L ab. Butyrat erreichte nach 17 h eine Konzentration von 1,4 g/L bevor es im Zuge der Umsetzung zu Butanol auf 0,25 g/L absank. Insgesamt wurden

aus 46,8 g/L Glucose 12,5 g/L Butanol und 4,2 g/L Aceton gebildet, was einem Butanolertrag von 27 % sowie einem Gesamt-Lösungsmittelertrag von 36 % entsprach. Die maximale Produktivität betrug $0,3 \text{ g(L}\cdot\text{h)}^{-1}$. Eine Ethanolbildung fand in beiden Ansätzen nicht statt. Der pH-Wert sank, im Zuge der Acidogenese, in 9 h von 6,5 auf 5 und stieg, durch die Bildung von Lösungsmittel, innerhalb von 120 h wieder auf 5,5 an. Die maximale OD_{535} lag nach 49 h bei 11,6.

Im Reaktor ohne H_2 -Begasung wurden nach 71 h 7,4 g/L Butanol und 2,5 g/L Aceton gemessen (Abbildung 3.3.7 B). Acetat nahm von 2,2 auf 0,4 g/L ab. Butyrat stieg nach 17 h auf 1,5 g/L an, erreichte nach 71 h 0,6 g/L und stieg nach 120 h wieder auf 0,8 g/L an. In Summe sind aus 38 g/L Glucose, 10 g/L Butanol und 3,2 g/L Aceton gebildet worden. Dies entsprach einer Butanolausbeute von 26 % und einer Gesamt-Lösungsmittelausbeute von knapp 35 %. Als maximale Produktivität konnten hier $0,16 \text{ g(L}\cdot\text{h)}^{-1}$ ermittelt werden. Der pH-Wert sank, beginnend von 6,5, auf 4,9 und pegelte sich zum Ende auf 5,6 ein. Zudem spiegelten die pH-Werte den langsameren Prozessverlauf wider.

Der Vergleich beider Reaktoransätze zeigte, dass eine H_2 -Begasung mit 1 mL/min eine Steigerung der Fermentationsgeschwindigkeit bewirkte. Die Anreicherung von H_2 in Medium und Gasphase zeigte einen positiven Effekt auf die Lösungsmittelproduktion. Die hier eingestellte geringere Rührgeschwindigkeit von 200 RPM trug, verglichen mit dem Ergebnis aus Abbildung 3.3.2 B auf Seite 64, ebenfalls zu einer Verbesserung des Fermentationsverlaufes in Reaktor **B** bei. Angesichts der Substratlimitierung nach 119 h im Reaktor **B** konnten die maximal möglichen Endkonzentrationen nicht ermittelt werden.

3.3.3 Vergleich der Fermentationen mit H_2 -Begasung oder Überdruck

Da solventogene Clostridien in der Lage sind ihre Reduktionsäquivalente selbst zu generieren [ALALAYAH ET AL. 2008], sollte es ausreichen die Bildung von H_2 zu hemmen. Um die H_2 -Freisetzung zu reduzieren, muss die Kultur mit H_2 angereichert sein. Um dies zu erreichen, wurden zwei mögliche Varianten getestet und verglichen (Abbildung 3.3.8). Ansatz **A** wurde wieder mit H_2 begast wobei der zugeführte H_2 und die gebildeten Gase über Gärröhrchen ungehindert entweichen konnten. Ansatz **B** wurde mit einem Druckbegrenzungsventil versehen, das ein Entweichen der selbst gebildeten

Ergebnisse und Diskussion

Gase bis zu einem Überdruck von 0,2-0,3 bar verhinderte, welche sich dadurch im Reaktor anreichern konnten. In beiden 200-mL-Reaktoren wurde *C. spba.* in 130 mL YA-Glucose-Medium bei 30 °C inkubiert und mit 200 RPM gerührt. Substrate und Produkte wurden zeitnah vermessen und gegebenenfalls Substrat, als konzentrierte, anoxische Glucoselösung, nachgeführt.

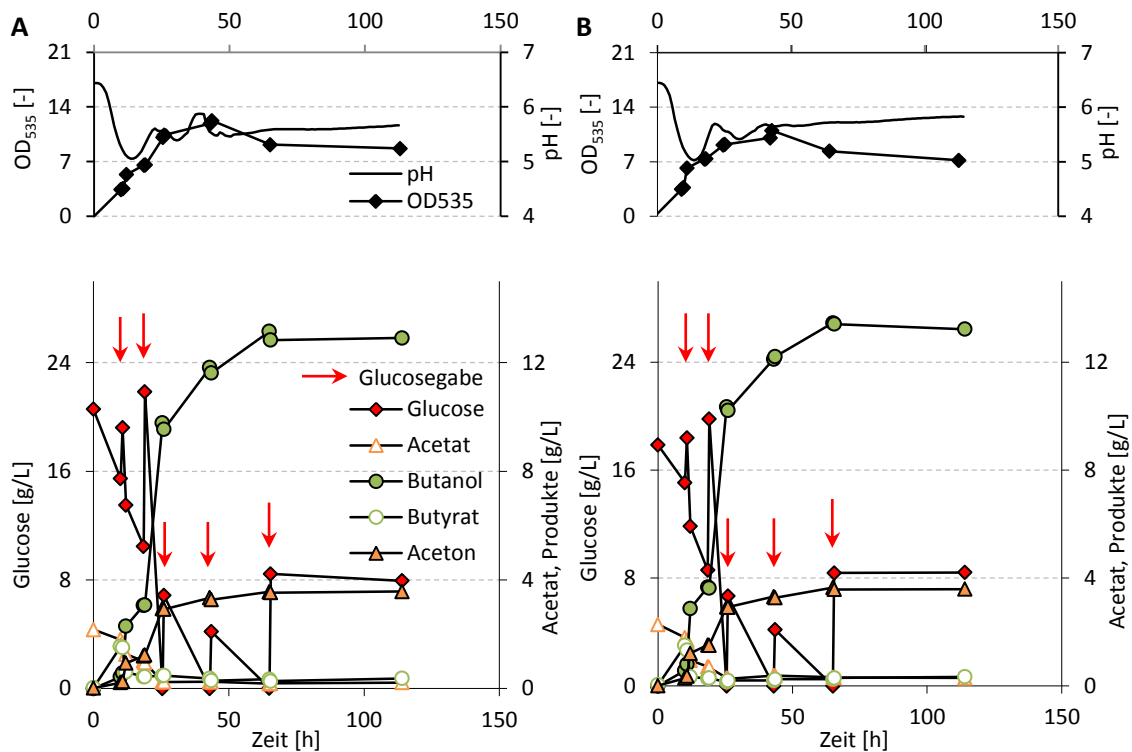


Abbildung 3.3.8: Konzentrationsverläufe der Substrate und Produkte sowie OD₅₃₅ und pH-Werte einer FedBatch-Parallelferrmentation mit *C. spba.* in 200 mL Glasreaktoren mit 130 mL YA-Glucose-Medium. 30 °C Inkubationstemperatur, 200 RPM Rührung, Reaktor mit H₂-Begasung (A) oder mit 0,2-0,3bar Überdruck (B); Start-pH-Wert: 6.5, ungeregelt

Im Reaktor mit H₂-Begasung (Abbildung 3.3.8 A) reduzierte sich die Acetatkonzentration in 26 h von 2,2 g/L auf 0,2 g/L. Butyrat nahm innerhalb von 10 h auf 1,5 g/L zu und sank, mit Beginn der solventogenen Phase, nach 12 h wieder auf 0,6 g/L und im weiteren Verlauf auf 0,3 g/L ab. Aceton erreichte innerhalb von 65 h eine Konzentration von 3,6 g/L. In dieser Zeit bildete *C. spba.* aus 47 g/L Glucose 13,1 g/L Butanol, was einem Butanolertrag von knapp 28 % entsprach. Von 19-26 h betrug die maximale Butanolproduktivität im mit H₂ begasten Ansatz A $0,96 \text{ g(L}\cdot\text{h)}^{-1}$. Nach 43 h erreichte die OD₅₃₅ ihren Höchstwert von 12,4 und sank bis zum Ende auf 8,7 ab. Der

pH-Wert fiel, beginnend bei 6,4, auf 5,0 ab, erreichte nach 21 h einen Wert von 5,6, fiel nach weiteren 8 h auf 5,4 und pegelte sich zum Schluss auf 5,6 ein.

Im Vergleichsreaktor **B** mit 0,2-0,3 bar Überdruck zeigte sich das gleiche Verlaufsmuster. Hier wurden 13,2 g/L Butanol aus 43 g/L Glucose gebildet und damit 4 g/L weniger Substrat verbraucht. Dies entsprach einem Butanolertrag 30,5 %. Pro Stunde konnten hier maximal 0,95 g/L Butanol gebildet werden. Die maximale OD₅₃₅ lag nach 43 h bei 11 und fiel zum Ende hin auf 7,1 ab. Ausgehend von einem Start-pH-Wert von 6,4 sank dieser in 12 h ebenfalls auf 5,0 ab, erreichte nach 21 h einen Wert von 5,7, fiel nach weiteren 8 h auf 5,4 und pegelte sich zum Schluss auf 5,8 ein.

Die Ergebnisse beider Fermentationen, mit YA-Glucose Medium und H₂-Begasung oder 0,2-0,3 bar Überdruck, zeigten fast identische Verläufe. Im Vergleich zum Ansatz mit H₂-Begasung konnten mit leichtem Überdruck ebenso gute Produktkonzentrationen erzielt werden. Eine Begasung mit H₂ während der Fermentation war daher nicht mehr nötig und wurde im Folgenden durch Anlegen eines Überdrucks von 0,2-0,3 bar ersetzt.

Zusammenfassung

Eine Durchmischung der Kultur beeinflusste die Endproduktbildung negativ. Der Einsatz eines Mediums ohne Trypton verstärkte den Effekt im Reaktor deutlich und führte unter den anfangs gewählten Fermentationsbedingungen (500 RPM, Atmosphärendruck) zu stark verringerten Produktkonzentrationen (z.B. 2,2 g/L Butanol). Ursache für den Einbruch der ABE-Konzentrationen war der Verlust von Reduktionsäquivalenten (NAD(P)H+H⁺), die aufgrund der Durchmischung verstärkt als H₂ in die Gasphase übergangen. Durch direkte oder indirekte Anreicherung der Kultur mit H₂ mittels H₂-Begasung oder Anlegen eines Überdrucks (0,2-0,3 bar) und zusätzlich verringerter Rührung (\leq 200 RPM) gelang es die Produktbildung zu verbessern und Produktkonzentrationen von über 13 g/L Butanol zu erreichen.

Warum Trypton die Produktbildung trotz Durchmischung und Gasfreisetzung begünstigte wurde aufgrund der Komplexität des Medienbestandteils sowie aus zeitlichen Gründen nicht näher untersucht. Da Trypton mit 6 g/L im Verhältnis zu den restlichen Medienbestandteilen (vgl. Tabelle 2.3.1, Seite 30) in hoher Konzentration vorlag könnte seine Wirkung als pH-Wert-Puffer nicht unbedeutend sein.

3.3.4 Einfluss von Ammonium und Acetat auf die Produktbildung

In diesem Vialversuch wurden Untersuchungen zum Einfluss der Medienbestandteile Ammonium und Acetat in Bezug auf die ABE-Bildung durchgeführt. Dazu sind die Medien YA, YA ohne Ammonium oder YA ohne Acetat mit 50 g/L Glucose für die Inkubation von *C. spba.* in 3-fach Ansätzen bei 30 °C genutzt worden.

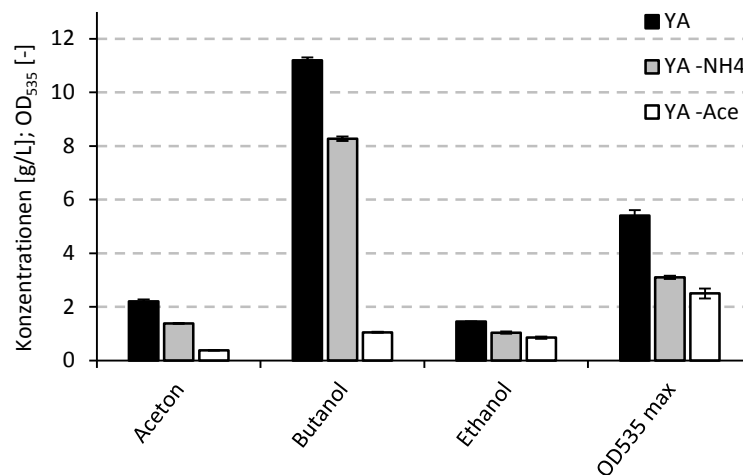


Abbildung 3.3.9: Endkonzentrationen und maximale OD₅₃₅ nach 154 h in 50-mL-Vials mit 30 mL verschiedener YA-Medienvarianten wie YA, YA-Medium ohne Ammonium (YA -NH₄) und YA-Medium ohne Acetat (YA-Ace) jeweils mit 50 g/L Glucose, inkubiert bei 30 °C als 3-fach-Ansatz, Start-pH-Wert: 6,3

Ohne die Stickstoffquelle Ammonium konnte eine Abnahme der Endkonzentrationen um 37 % Aceton (0,8 g/L), 26 % Butanol (3 g/L) und 28 % Ethanol (0,4 %) beobachtet werden (Abbildung 3.3.9).

Ohne Acetatzugabe, zeigte sich eine Abnahme der Lösungsmittelkonzentrationen um 83 % bei Aceton (1,8 g/L), über 90 % bei Butanol (10,1 g/L) und 41 % bei Ethanol (0,6 g/L).

Obwohl *C. spba.* dazu befähigt ist selbst Acetat zu bilden, begünstigt die Zugabe von Acetat (2,5 g/L) das Zellwachstum um 54 % und die Produktbildung um bis zu 90 % (Butanol). Arbeiten von REILLY ET AL. [1920], BERNHAUER & KURSCHNER [1935] und CHEN & BLASCHEK [1999a], [1999b] zeigten ebenfalls, dass Acetat als Zusatz im Medium die Lösungsmittelbildung in der ABE-Fermentation und die Zelldegeneration von *C. beijerinckii* positiv beeinflusste. Der Einfluss verschiedener Acetatkonzentrationen auf die Produktbildung durch *C. spba.* wurde im Reaktor genauer untersucht (Kapitel 3.5, Seite 82).

3.3.5 Einfluss von Hefeextrakt auf die Produktbildung

Hefeextrakt gehört wie Trypton zu den Komplexbestandteilen im Medium und ist mit 6,00 €/Kg [MADDIPATI ET AL. 2011] ein bedeutender Kostenfaktor für den Fermentationsprozess. Im YA-Medium wurden 2 g/L Hefeextrakt eingesetzt, um am Ende der Fermentation eine Konzentration von etwa 15 g/L Butanol zu erhalten (Abbildung 3.3.8, Seite 74). Daraus ließen sich Kosten für Hefeextrakt in Höhe von 0,80 €/Kg Butanol berechnen. Deshalb wurde geprüft, wie groß der Einfluss der Hefeextrakt-Konzentration auf den Prozess ist und ob auch in einer Fermentation ohne Hefeextrakt vergleichbare Produktkonzentrationen möglich wären.

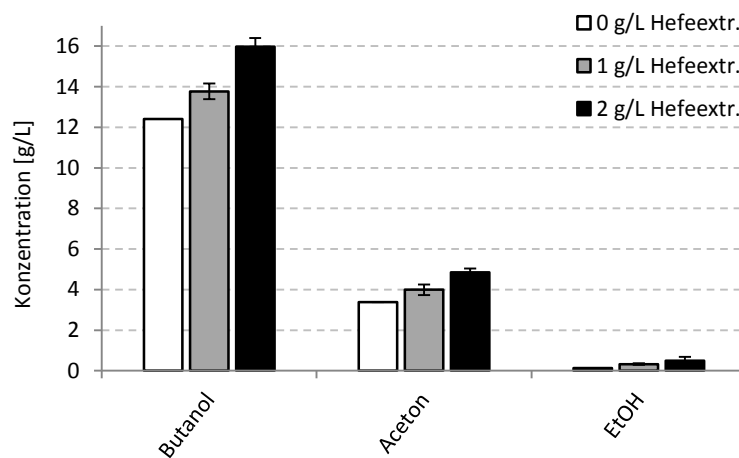


Abbildung 3.3.10: Endkonzentrationen der Produkte aus dem Inkubationsversuch mit 60 mL YA-Medium, 75 g/L Glucose und verschiedenen Hefeextrakt-Konzentrationen in 100-mL-Schraubglasflaschen mit Gärverschluss bei einer Inkubationstemperatur von 26 °C im Schüttler mit 150 RPM für 23 Tage; Hefeextrakt-Konzentrationen: 0 g/L, 1 g/L, 2 g/L; Start-pH-Wert: 6,3

Der Versuch fand in 100-mL-Schraubglasflaschen statt, welche mit Gärverschluss versehen waren, um ein Entweichen der Gase unter anoxischen Bedingungen zu gewähren. Zusätzlich sind die Gärröhrchen mit mehreren Lagen Parafilm® verschlossen worden, um die Entwicklung eines leichten Überdrucks während der Inkubation zu ermöglichen. Dies sollte eine Anreicherung der Gase im Medium begünstigen. Die Probenahme erfolgte zu Beginn und am Ende des Versuchs (nach 23 Tagen), um das System so wenig wie möglich zu stören.

Wie in Abbildung 3.3.10 erkennbar, führte die Zugabe von Hefeextrakt zu einer signifikanten Steigerung der Produkt-Endkonzentrationen. Aber selbst im Ansatz ohne Hefeextrakt konnten Endkonzentrationen von 3,4 g/L Aceton, 12,4 g/L Butanol und 0,1 g/L Ethanol aus 54,3 g/L Glucose erreicht werden. Mit 1 g/L Hefeextrakt wurden

13,7 g/L Butanol, 4,0 g/L Aceton und 0,3 g/L Ethanol aus 56,5 g/L Glucose gebildet. 15,9 g/L Butanol, 4,9 g/L Aceton sowie 0,5 g/L Ethanol ergaben sich aus dem Ansatz mit 2 g/L Hefeextrakt, in dem 64,4 g/L Glucose verbraucht wurden. Ohne Hefeextrakt betrug der Butanolertrag 22,8 %, mit 1 g/L Hefeextrakt 24,2 % und mit 2 g/L Hefeextrakt 24,7 %.

Eine Fermentation ohne Hefeextrakt ist möglich und erzielte zudem annehmbare Produktkonzentrationen von 12,4 g/L. Im 3-fach-Ansatz ohne Hefeextrakt war jedoch nur eine Kultur angewachsen. Hefeextrakt begünstigte scheinbar das Zellwachstum in der Lagphase.

3.3.6 Optimierung der Inkubationstemperatur in Vials und im Reaktor

Aus der biotechnischen Ethanolproduktion mit bestimmten Hefen ist bekannt, dass bei geringeren Temperaturen die letale Wirkung des Alkohols verringert wird und somit höhere Endkonzentrationen erzielt werden können [MEIER 2001; STRAND & HIESCHE 2004].

Bei geringeren Temperaturen sinken die Reaktionsgeschwindigkeiten für enzymatische oder chemische Prozesse und demzufolge auch für Stoffwechselaktivitäten. Die Fluidität von Zellmembranen ist ebenfalls Temperaturabhängig und sinkt tendenziell mit der Temperatur [LANGER 2008]. Durch die Einwirkung von Lösungsmitteln, welche in die Membran eindringen können, erhöht sich die Membranfluidität [DE BONT 1998]. Die Absenkung der Temperatur könnte den Einfluss der Lösungsmittel auf die Fluidität der Zellmembran kompensieren und eine höhere Butanoltoleranz ermöglichen. Dies würde allerdings zu Lasten der Stoffwechselaktivität und damit auch der Produktivität gehen. Der Einfluss der Inkubationstemperatur ist für eine Optimierung im Vial sowie im Reaktor untersucht worden (siehe 3.3.6.1, Seite 78 und 3.3.6.2, Seite 80).

3.3.6.1 Einfluss der Inkubationstemperatur im Vialversuch

In einem Vialversuch ist zuvor ermittelt worden, bei welchen Temperaturen eine Lösungsmittelproduktion möglich war und wo das Temperaturoptimum liegen könnte.

In 100-mL-Vials mit 50 mL YA-Medium und 60 g/L Glucose wurde *C. spba.* für 19 Tage bei verschiedenen Temperaturen von 4-30 °C inkubiert. Über die ermittelten Substrat-

Ergebnisse und Diskussion

und Produktkonzentrationen konnte der optimale Temperaturbereich abgeschätzt werden.

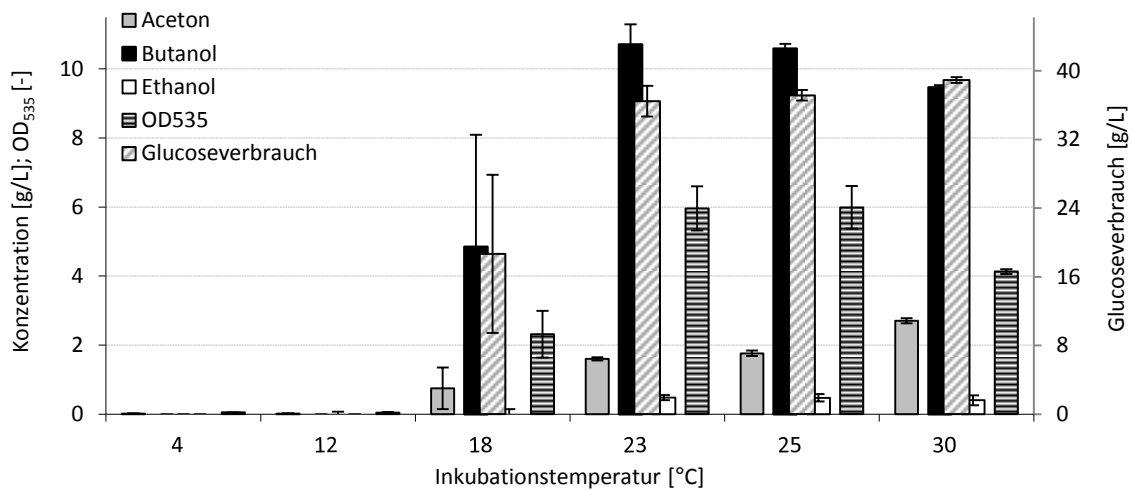


Abbildung 3.3.11: Substrat- und Produkt-Endkonzentrationen sowie OD₅₃₅ des Temperaturversuchs in 100-mL-Vials nach 19 Tagen mit *C. spba.* in 50 mL YA-Medium mit 60 g/L Glucose bei verschiedenen Inkubationstemperaturen. Start-pH-Wert: 6,3

Aus Abbildung 3.3.11 wird deutlich, dass bei Inkubationstemperaturen von 4 °C und 12 °C kein Wachstum und keine Konversion des Substrats zu Aceton, Butanol oder Ethanol stattgefunden haben. Bei 18 °C wurde eine OD₅₃₅ von 2,3 ermittelt. *C. spba.* verbrauchte 19 g/L Glucose und bildete 4,9 g/L Butanol sowie 0,8 g/L Aceton. Der Ansatz mit einer Temperatur von 23 °C erreichte eine OD₅₃₅ von 6 und Lösungsmittelkonzentrationen von 10,7 g/L Butanol, 1,6 g/L Aceton und 0,5 g/L Ethanol, wobei 36,4 g/L Glucose verwertet wurden. Mit 25 °C konnten ähnliche Werte von Butanol (10,5 g/L), Aceton (1,8 g/L) und Ethanol (0,5 g/L) aus 37,1 g/L Glucose erreicht werden. Die OD₅₃₅ lag hier ebenfalls bei 6. Der 30 °C Ansatz zeigte eine geringere OD₅₃₅ (4,1) sowie niedrigere Alkoholkonzentrationen von 9,5 g/L Butanol und 0,4 g/L Ethanol jedoch eine erhöhte Acetonkonzentration (2,7 g/L) sowie einen gesteigerten Glucoseverbrauch von 38 g/L. Die prozentualen Produktanteile (A+B+E=100%) veränderten sich in den verschiedenen Temperaturansätzen ab 23 °C aufwärts. Der Butanolanteil in den Kulturen betrug bei 23 °C, 25 °C und 30 °C jeweils 83 %, 82 % und 75 %. Der Butanolertrag sank ebenfalls mit steigender Temperatur von 29 % bei 23 °C auf 24 % bei 30 °C. Für Aceton zeigte sich jedoch ein gegenläufiger Effekt zur Temperatur mit jeweiligen Anteilen von 12 % (23 °C), 14 % (25 °C) und 21 % (30 °C).

Bei geringeren Temperaturen (23-25 °C) konnten tatsächlich höhere Butanolkonzentrationen beobachtet werden als bei 30 °C. Darüber hinaus wurde bei niedrigeren Temperaturen weniger Aceton gebildet. Acetonbildung und Glucoseverbrauch verhielten sich proportional zur Temperatur. Zwischen 23 °C und 30 °C zeigte sich, mit abnehmender Temperatur (30 °C → 23 °C), ein Anstieg in der Butanol-Endkonzentration (9,5 g/L → 10,7 g/L) sowie des Butanolertrags (24 % → 29 %). Alkohol-Endkonzentrationen und OD₅₃₅-Werte verhielten sich proportional zueinander mit den höchsten Konzentrationen bei 23 °C und 25 °C. Da sich die Butanol-Endkonzentration zwischen 25 °C und 30 °C um weniger als 1 g/L unterschieden besteht die Möglichkeit, dass das Temperaturoptimum zwischen diesen beiden Werten liegt, was im Reaktorversuch untersucht wurde (siehe 3.3.6.2).

3.3.6.2 Einfluss der Inkubationstemperatur im Reaktorversuch

Die Erkenntnisse aus den Vialversuchen wurden in einem enger gefassten Temperaturbereich von 22 °C bis 32 °C in vier gleichen 200-mL-Reaktoren überprüft. *C. spba.* inkubierte unter optimierten Bedingungen (0,2-0,3 bar, 200 RPM) in 130 mL YA-Medium mit 75 g/L Glucose bei Temperaturen von 22 °C, 25 °C, 27 °C und 32 °C.

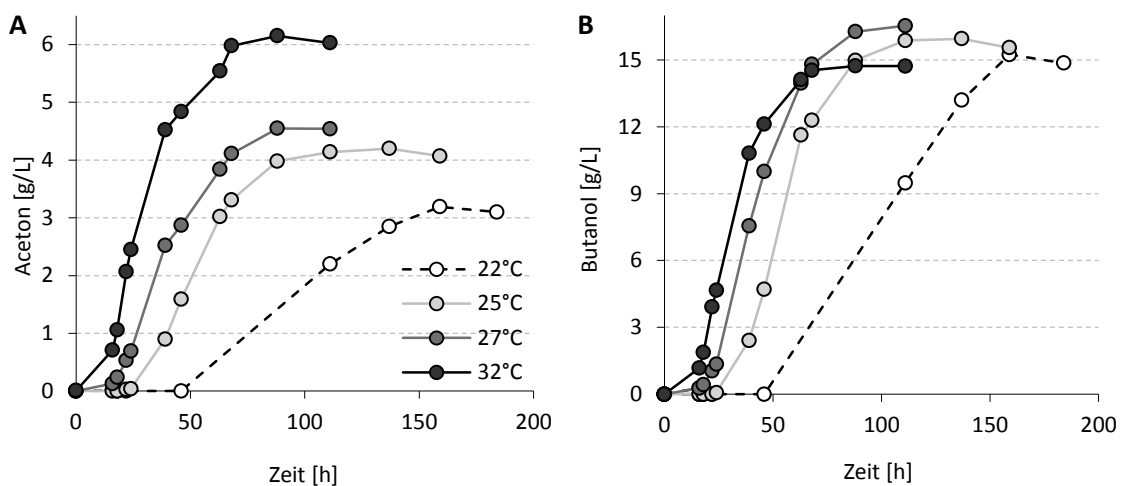


Abbildung 3.3.12: Verlauf der Aceton- (A) und Butanolkonzentrationen (B) während einer Batch-Fermentation mit *C. spba.* in 130 mL YA-Medium und 75 g/L Glucose bei verschiedenen Temperaturen mit einem Überdruck von 0,2-0,3 bar und einer Rührung von 100 RPM. Start-pH-Wert: 6,3

Abbildung 3.3.12 A zeigt den Verlauf der Acetonkonzentrationen in den vier Reaktoransätzen. Nach 88 h sind 6,2 g/L Aceton im 32 °C-Ansatz und 4,6 g/L im Reaktor mit 27 °C erreicht worden. Mit 25 °C konnte erst nach 137 h eine Acetonkonzentration von 4,2 g/L gemessen werden. Bei 22 °C dauerte es 159 h bis 3,2 g/L Aceton gebildet

wurden, wobei hier die Lag-Phase schon etwa 50 h ausmachte. Die Acetonbildung stieg auch im Reaktor proportional zur Temperatur an (Abbildung 3.3.12 A), was die Ergebnisse aus dem vorherigen Vialversuch bestätigte.

Die Verläufe der Butanolkonzentrationen sind in Abbildung 3.3.12 B dargestellt. Mit einer Temperatur von 32 °C wurde nach 88 h eine Butanolkonzentration von 14,7 g/L ($0,17 \text{ g(L}\cdot\text{h)}^{-1}$) erreicht. Bei 27 °C verstoffwechselte *C. spba.* das Substrat zu Butanol mit einer maximalen Konzentration von 16,5 g/L in 111 h ($0,15 \text{ g(L}\cdot\text{h)}^{-1}$). Mit 25 °C wurden knapp 16 g/L nach 137 h ($0,12 \text{ g(L}\cdot\text{h)}^{-1}$) erreicht und im Ansatz mit 22 °C konnten nach 159 h 15,6 g/L ($0,10 \text{ g(L}\cdot\text{h)}^{-1}$) nachgewiesen werden.

In jedem Reaktoransatz waren zum Ende der Fermentation noch mindestens 8 g/L Glucose in Lösung (siehe Anhang Abbildung 6.1.1, Seite 124). In den Reaktoren stieg die Gesamtproduktivität mit der Temperatur an. Die maximale Butanol-Endkonzentration wurde jedoch schon bei 27 °C, mit einer nur um $0,02 \text{ g(L}\cdot\text{h)}^{-1}$ verringerten Gesamtproduktivität (vgl. 32 °C), erreicht. Des Weiteren ist an den Kurvenverläufen zu erkennen, dass mit einer höheren Inkubationstemperatur die Acetonkonzentration anstieg und bei 32 °C mit 1,6 g/L um 35 % höher lag als bei 27 °C.

In Bezug auf die Butanol-Endkonzentration, die Fermentationsgeschwindigkeit und eine möglichst geringe Nebenproduktbildung stellte eine Inkubationstemperatur von 27 °C das Optimum dar.

3.4 Butanoltoxizität bei *C. saccharoperbutylacetonicum*

Da schon aus der Literatur [LIU & QURESHI 2009] eine hemmende Wirkung des Butanols und somit als begrenzender Faktor im ABE-Prozess bekannt ist, war eine Prüfung der genauen Hemmkonzentration unerlässlich. Dabei wurde ein Inkubationsversuch mit *C. spba.* in 50-mL-Vials mit 30 mL YA-Medium und 25 g/L Glucose sowie verschiedenen Butanol-Startkonzentrationen (9,5, 11, 13, 15, 17 und 19 g/L) durchgeführt. Nach 27 Tagen Inkubation erfolgte die Probenahme, um Substrat und Produktkonzentrationen zu ermitteln. Anhand der ermittelten Glucose- und Produktkonzentrationen konnte die toxische Wirkung der jeweiligen zugegebenen Butanolkonzentration abgeschätzt werden.

Ergebnisse und Diskussion

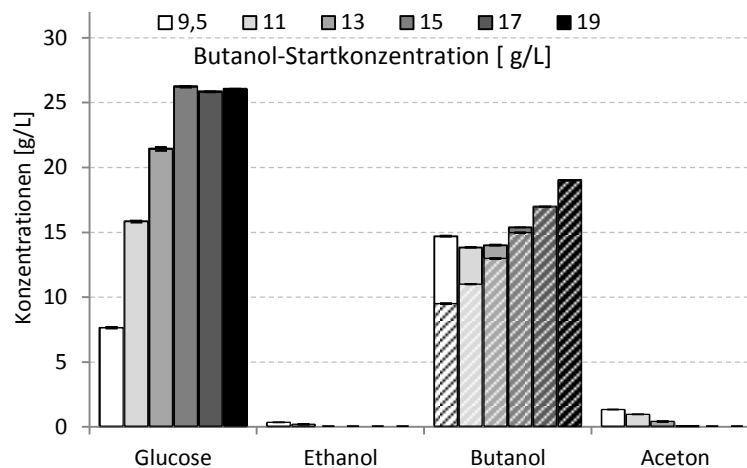


Abbildung 3.4.1: Endkonzentrationen im Butanol-Toxizitätstest bei 27 °C in 50-mL-Vials mit 30 mL YA-Medium und 25 g/L Glucose sowie verschiedenen Butanolkonzentrationen für 27 Tage inkubiert; schraffierte Balken stellen die vorgelegten Butanol-Konzentrationen dar; ausgefüllte Balken stellen Endkonzentrationen dar.

Mit 13 g/L Butanol wurden 4,5 g/L Glucose verwertet und 0,4 g/L Aceton gebildet (Abbildung 3.4.1). Ab 15 g/L Butanol fand keine Glucoseverwertung oder Produktbildung statt. Im Ansatz mit geringeren Butanol-Startkonzentrationen (9,5 g/L) wurden in der Endprobe 14,7 g/L Butanol ermittelt. Eine 100 %ige Hemmung trat bei einer Butanolkonzentration von etwa 15 g/L ein.

3.5 Verwertbarkeit verschiedener Substrate

Um das Substratspektrum von *C. spba.* zu untersuchen, wurden verschiedene Mono- und Disaccharide, Galacturonsäure und Glycerin in 50-mL-Vials mit 30 mL YA-Medium, bei 30 °C für mindestens 120 h inkubiert und auf ihre Verwertbarkeit hin getestet. Als Indikatoren dienten die Endkonzentrationen von Aceton und Butanol. Später wurden auch komplexere Substrate, wie Weizenkaff, Weizenkleie, Orangenschalen sowie Zuckerrübe und Weizenkaff-Hydrolysat untersucht.

3.5.1 Mono- und Disaccharide

Im Folgenden sind verschiedene Mono- und Disaccharide getestet worden. Die Inkubation erfolgte unter den zuvor genannten Bedingungen für 8 Tage. Da die Zucker in Stoffmengenkonzentrationen (mM) statt in Massenkonzentrationen (g/L) eingewogen wurden, sind die ermittelten Endkonzentrationen zur besseren Vergleichbarkeit in $\text{g}_{\text{Produkt}}/\text{g}_{\text{Substrat}}$ bzw. in $\text{mM}_{\text{Produkt}}/\text{mM}_{\text{Substrat}}$ dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

Der Zuckertest zeigte, dass D-Arabinose und D-Ribose für *C. spba.* nicht verwertbar waren (Abbildung 3.5.1 A, B). L-Rhamnose wurde ebenfalls nur sehr wenig genutzt, und zu 0,03 gButanol/gSubstrat (g/g) umgewandelt (Abbildung 3.5.1 A). Einige Zucker, wie L-Arabinose (0,33 g/g), Xylose (0,34 g/g), D-Galactose (0,34 g/g), D-Mannose (0,36 g/g) oder Saccharose (0,35 g/g) wurden besser verwertet als Glucose (0,26 g/g) oder Trehalose (0,28 g/g). Dieser Trend war für Aceton in ähnlicher Weise zu erkennen (Abbildung 3.5.1).

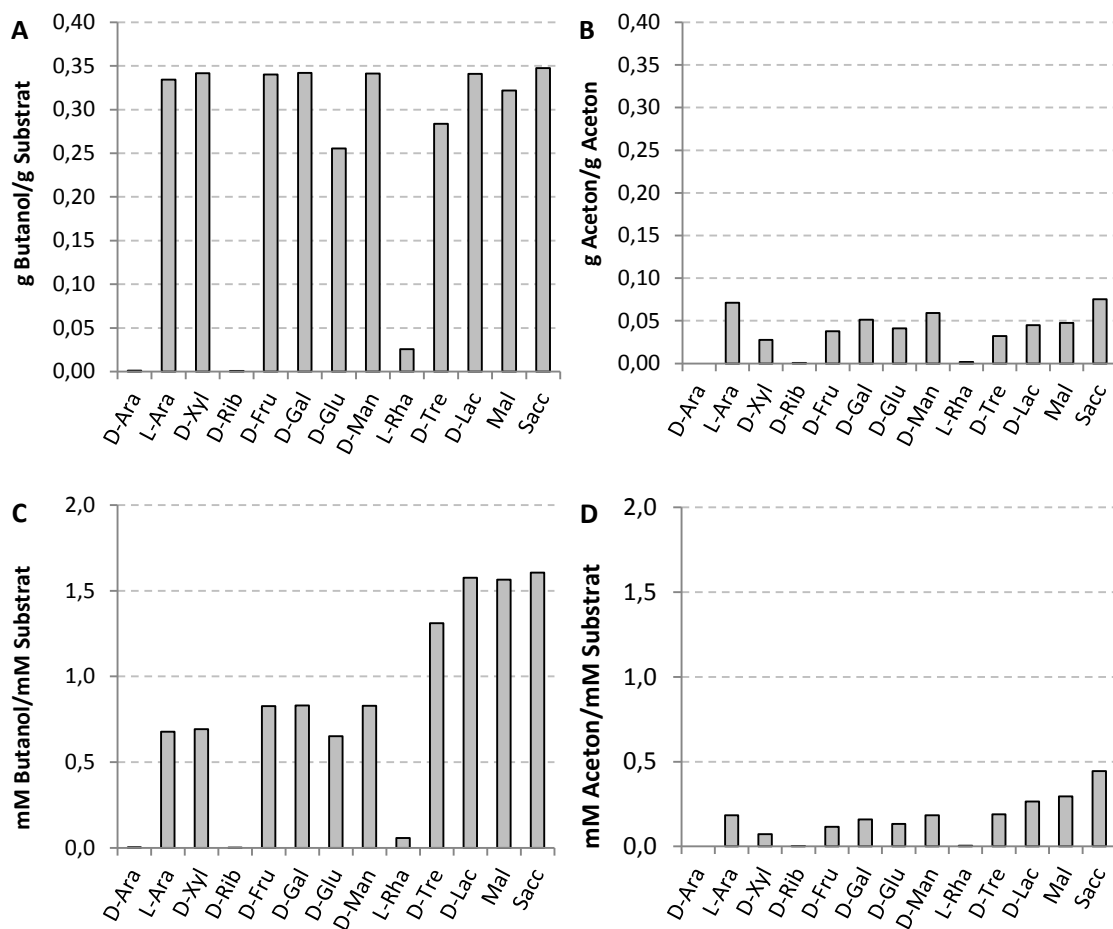


Abbildung 3.5.1: Berechnete Butanol- (A, C) und Aceton-Endkonzentrationen (B, D) pro eingesetztem Substrat, Vergleich verschiedener Zucker in 50-mL-Vials mit 30 mL YA-Medium, bei 30 °C, Start-pH-Wert: 6,5

C. spba. konnte viele der getesteten Mono- und Disaccharide (10 von 13) für die Lösungsmittelbildung nutzen, was auf ein breites Substrat-Nutzungsspektrum hinweist. Wie schon durch KEIS ET AL. [2001] beschrieben, kann *C. spba.* eine Vielzahl an Mono- und Disacchariden verwerten. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass *C. spba.* Fructose, D-Galactose und L-Arabinose, aber keine D-Arabinose verwerten kann. Mit

Glucose und Trehalose wurden schlechtere Butanol-Ausbeuten erzielt als z.B. mit Mannose, Saccharose oder Galactose (Abbildung 3.5.1).

Die Darstellung in $\text{mM}_{\text{Produkt}}/\text{mM}_{\text{Substrat}}$ (Abbildung 3.5.1 C, D) zeigt, dass unter den C-12-Zuckern mit D-Lactose und Saccharose die höchsten Produktkonzentrationen erreicht werden konnten. Unter den C-5- und C-6-Zuckern sind L-Arabinose, D-Xylose, D-Fruktose, D-Galactose und D-Mannose mit einem hohen Produkt-/Substratverhältnis zu den Endprodukten umgewandelt worden.

3.5.2 Glycerin

Glycerin fällt mit etwa 10 % als Nebenprodukt bei der Biodieselproduktion an [YAZDANI & GONZALEZ 2007]. Nach KEIS ET AL. [2001] kann es als alleinige C-Quelle nicht von *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 genutzt werden. Einige andere Clostridienarten wie *C. acetobutylicum*, *C. butylicum*, *C. beijerinckii* oder *C. butyricum* können Glycerin als C-Quelle für die Konversion zu 1,3-Propandiol als Hauptprodukt verwerten [FORSBERG 1987; WILKENS ET AL. 2012]. Aufgrund dessen wurde es als Substrat für den hier verwendeten Stamm getestet. Dazu wurden die Zellen in 30 mL YA-Medium mit 40 g/L Glycerin für 120 h bei 30 °C in 50-mL-Vials inkubiert.

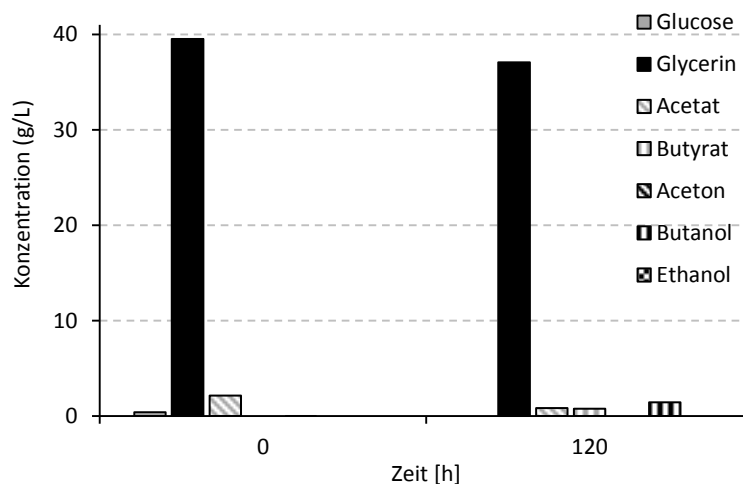


Abbildung 3.5.2: Substrat und Produktkonzentrationen aus den Substrattests mit Glycerin in 30 mL YA-Medium, inkubiert in 50-mL-Vials bei 30 °C für 120 h, 3-fach-Ansatz (Standardabweichung < 0,1)

Lediglich 2,4 g/L Glycerin verbrauchte *C. spba.* unter Verwendung von Acetat und der restlichen Glucose (0,4 g/L), welche aus der aktiven Vorkultur stammte und bildete 1,4 g/L Butanol (Abbildung 3.5.2). In Ansätzen ohne Hefeextrakt konnte keine

Abnahme von Glycerin oder die Bildung von Lösungsmitteln beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Nach 120 h waren 0,7 g/L Butyrat und 0,8 g/L Acetat in der Kultur nachweisbar. Als alleinige C-Quelle konnte Glycerin nicht verwertet werden. Mit Zugabe einer weiteren C-Quelle wie Glucose scheint jedoch eine Umsetzung von Glycerin zu Butanol möglich.

3.5.3 Galacturonsäure

Apfeltrester, Zuckerrübenschnitzel oder Schalen von Citrusfrüchten sind günstige Rohstoffe für die Pektinengewinnung [HERBSTREITH-FOX 2014]. Hauptbestandteil und wichtigstes Monomer der Pektine ist die Galacturonsäure. Damit stellen die oben genannten Rohstoffe eine Quelle für die Gewinnung von Galacturonsäure dar. Diese wiederum könnte als Substrat für die biotechnische Konversion zu höherwertigen Produkten dienen. Infolgedessen wurde die Verwertbarkeit der organischen Säure für *C. spba.* getestet. In 30 mL YA-Medium mit 10 g/L Galacturonsäure wurde *C. spba.* für 120 h bei 27 °C in 50-mL-Vials im 3-fach-Ansatz inkubiert.

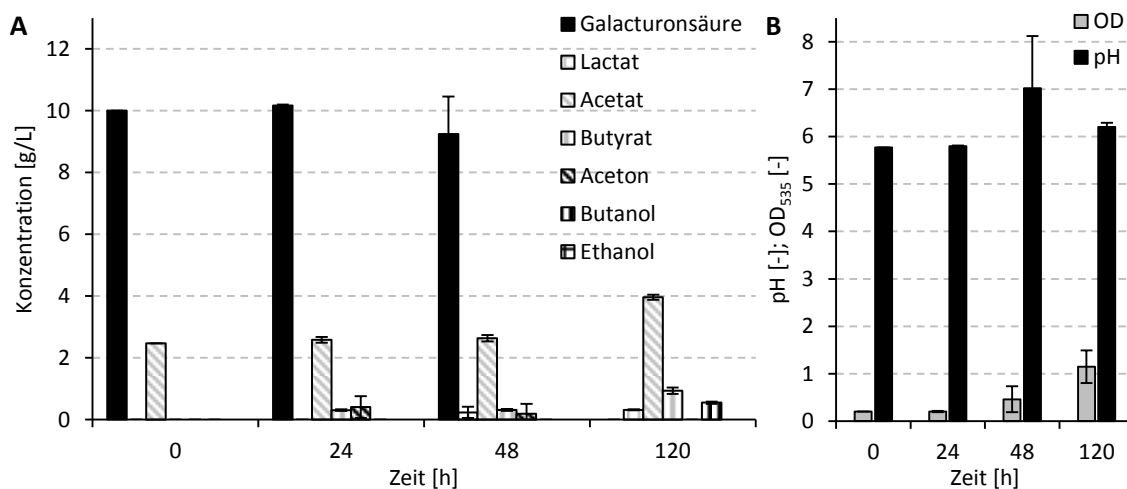


Abbildung 3.5.3: Konzentrationen (A) sowie pH-Werte und OD₅₃₅ (B) über die Zeit in YA-Medium mit Galacturonsäure als Substrat, *C. spba.* inkubiert bei 27 °C in 30-mL-Ansätze in 50-mL-Vials, 3-fach-Ansatz.

Erst nach 48 h Inkubation war eine Abnahme der Galacturonsäure zu beobachten. Nach dem vollständigen Verbrauch der eingesetzten 10 g/L Galacturonsäure wurden innerhalb von 120 h 0,5 g/L Butanol gebildet (Abbildung 3.5.3 A). Im Vergleich zur geringen Lösungsmittelkonzentration lagen die Säuren Acetat und Butyrat mit jeweils 3,9 g/L und 0,9 g/L in verhältnismäßig hohen Konzentrationen vor. Dies sprach für eine unvollständige Umwandlung der Säuren zu den Endprodukten. Außerdem erreichte die

Kultur nach 120 h nur eine geringe Zelldichte mit einer OD_{535} von knapp 1,2 (Abbildung 3.5.3 B).

Vorrangig wurden Säuren wie 1,5 g/L Acetat, 0,9 g/L Butyrat und 0,3 g/L Lactat in der Kultur gebildet. Nur 0,5 g/L Butanol entstanden während der Inkubation. Da als Substrat eine Säure eingesetzt wurde, durch deren Verbrauch der pH-Wert anstieg (Abbildung 3.5.3 B), bildeten die Zellen vorrangig Säuren, die, ohne eine Induktion durch ein Absinken des pH-Wertes, nicht zu Alkoholen umgewandelt wurden. Bevor die Mehrheit der Zellen in die solventogene Phase umschalten konnte war das Substrat bereits verbraucht, weshalb nur wenig Endprodukt gebildet wurde. Eine Nutzung der Galacturonsäure als Substrat für den ABE-Prozess wäre in einem pH-Wert-geregelten Verfahren denkbar.

3.5.4 Rohsubstrate

3.5.4.1 Weizenkaff, Weizenkleie, Orangenschale, entpektinisierte Orangenschale

In folgenden Vialversuchen sind Substrate wie Weizenkaff, Weizenkleie, Orangenschale oder entpektinisierte Orangenschale auf ihre Verwertbarkeit für den ABE-Prozess getestet worden. Die zerkleinerten Substrate wurden mit jeweils 50 g/L Trockenmasse in YA-Medium autoklaviert. Nach dem Animpfen der 30-mL-Ansätze inkubierten sie für 150 h bei 30 °C in 50-mL-Vials. Die Zelldichte konnte wegen der hohen Eigentrübung der Substrate im Medium nicht über die OD_{535} bestimmt werden.

Ergebnisse und Diskussion

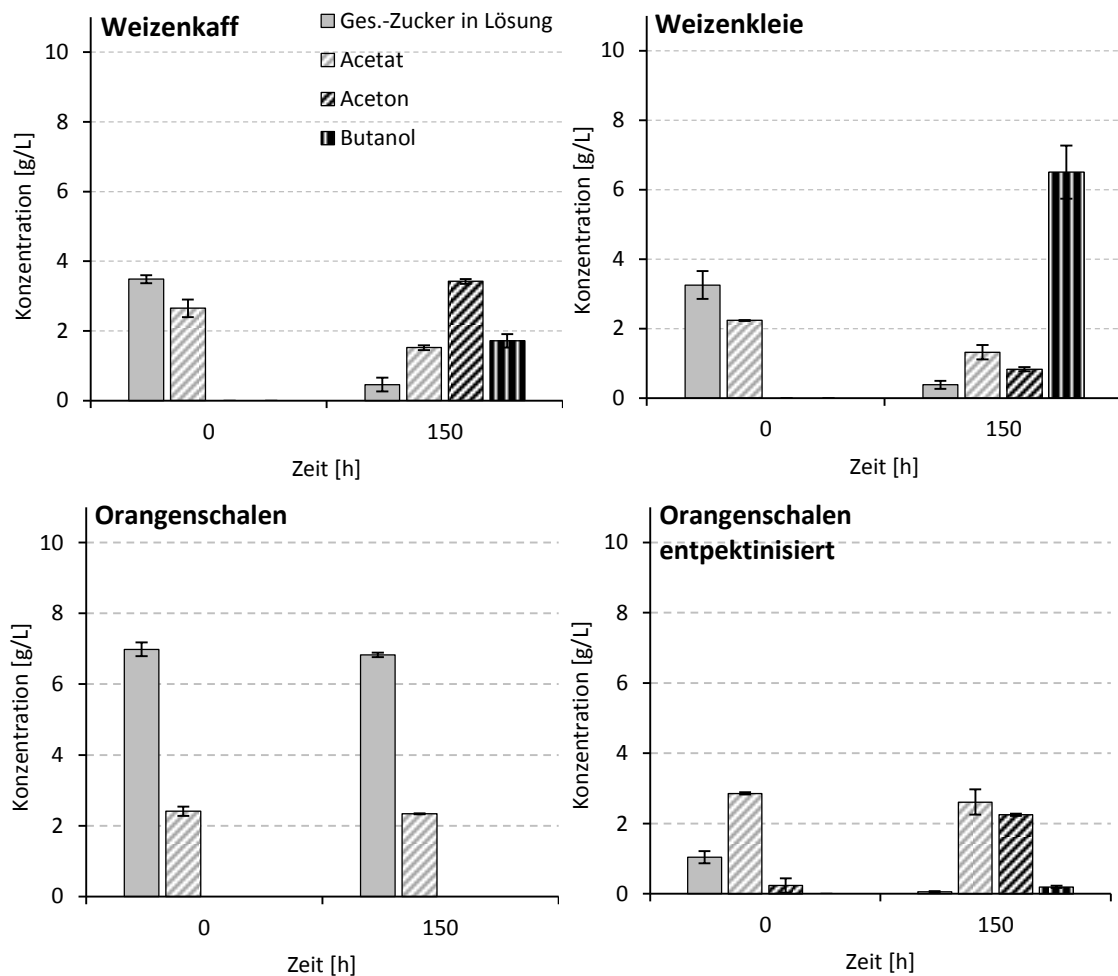


Abbildung 3.5.4: Substrat und Produktkonzentrationen im Inkubationsversuch mit *C. spba.* in YA-Medium mit jeweils 50 g/L Weizenkaff, Weizenkleie, Orangenschale oder ausgelagte Orangenschale als Substrat, inkubiert bei 30 °C für 150 h. Start-pH-Werte: 6,6-7,0

Weizenkaff oder -spreu ist ein Reststoff, der beim Dreschen von Getreide entsteht und mit 1-2 t/ha [STREIT ET AL. 2011] bei der Getreideernte anfällt. Es besteht aus Samenhülsen, Spelzen, Grannen, Schalen, Schoten, Korn-, Blatt- oder Stängelteilen eines Fruchtstandes [RIES ET AL. 1957]. Bestandteile des Weizenkaffs sind Cellulose, Hemicellulose, Lignin und Silikate [KUMAKURA & KAETSU 1984]. Als Reststoff würde es nicht mit der Verwendung als Nahrungsmittel konkurrieren und wäre aufgrund seines hohen potentiellen Kohlehydratgehaltes ein geeignetes Substrat. Im autoklavierten Weizenkaff-Ansatz (Abbildung 3.5.4) lagen zu Beginn des Versuchs 3,5 g/L Zucker und 2,6 g/L Acetat vor. Nach 150 h waren 0,5 g/L Zucker, 1,5 g/L Acetat, 3,4 g/L Aceton und 1,7 g/L Butanol in Lösung. Unter Verbrauch von 3 g/L gelöstem Zucker (Glucose, Xylose, Arabinose) und 1,1 g/L Acetat entstanden 5,1 g/L Lösungsmittel. Die ermittelte Substratkonzentration in Lösung war für die gebildete Menge an Produkten zu gering.

Allein für die 1,7 g/L Butanol hätte *C. spba.* rein rechnerisch 5-6 g/L Zucker benötigt. Dies ist ein Hinweis, dass *C. spba.*, wie auch andere Clostridien [VIRUNANON ET AL. 2008], über cellulolytische Enzyme verfügt, die einen enzymatischen Aufschluss des cellulose- und hemicellulosehaltigen Rohsubstrats ermöglichen.

Weizenkleie ist ein Rückstand in der Mehlerzeugung und besteht zum größten Teil aus zurückbleibender Stärke, Hemicellulose, Cellulose, Proteinen und Lignin [CHOTEBORSKA ET AL. 2004; PALMAROLA-ADRADOS ET AL. 2005]. Mit dem Weizenkleie-Ansatz (Abbildung 3.5.4) waren anfangs 3,3 g/L Zucker und 2,2 g/L Acetat in Lösung. In der Endprobe konnten 0,4 g/L Glucose, 1,3 g/L Acetat, 0,8 g/L Aceton und 6,5 g/L Butanol im Überstand ermittelt werden. Auch hier wurde mehr Produkt gebildet, als aus der zu Beginn in Lösung nachgewiesenen Zuckerkonzentration möglich gewesen wäre. Durch das Vorhandensein von Amylasen und cellulolytischen Enzymen [KEIS ET AL. 2001; VIRUNANON ET AL. 2008] konnten Stärke, Cellulose oder Hemicellulose zu verwertbaren Zuckern aufgespalten werden, weshalb am Ende Lösungsmittel in höheren Konzentrationen als erwartet vorlagen.

Im Ansatz mit getrockneten Orangenschalen (Abbildung 3.5.4), lagen durch partielle Autolyse [RIVAS ET AL. 2008] bereits Zuckerkonzentrationen von knapp 7 g/L in Lösung vor. Die Zucker- (Arabinose, Galactose, Xylose, Rhamnose) oder Acetatkonzentration zeigten jedoch nach der Inkubation keine signifikante Abnahme. In der Endprobe konnten auch keine Endprodukte nachgewiesen werden.

Im Medienansatz mit entpektinisierten Orangenschalen (Abbildung 3.5.4) lagen 1,0 g/L Zucker (Arabinose, Galactose, Xylose, Rhamnose) und 2,9 g/L Acetat vor. Der gesamte Zucker sowie 0,6 g/L Acetat wurden verbraucht und in 0,2 g/L Aceton und 0,2 g/L Butanol umgewandelt.

Weizenkleie war aufgrund des von Natur aus hohen Gehaltes an leichter spaltbaren Kohlenhydraten wie Hemicellulose und insbesondere Stärke, verglichen mit cellulosereicheren Substraten wie Weizenkaff, das bessere Substrat. Es befähigte *C. spba.* zu einer Produktion von 6,5 g/L Butanol und 0,8 g/L Aceton, was einem Verhältnis Butanol : Aceton von 8 : 1 entspricht. Aus Weizenkaff wurde doppelt so viel Aceton (3,4 g/L) wie Butanol (1,7 g/L) gebildet. Weizenkaff und Weizenkleie wurden zudem durch *C. spba.* während der Fermentation weiter aufgeschlossen, da mehr

Lösungsmittel gebildet wurde als theoretisch aus der anfangs gelösten Zuckerkonzentration möglich wäre. Orangenschalen waren als weitgehend unvorbehandeltes Substrat ungeeignet, da entweder hemmende Stoffe, wie z.B. Terpene [SETTANNI ET AL. 2012] enthalten sein können oder nur wenig verfügbares Substrat vorhanden war (Abbildung 3.5.4). Ethanol war in den Ansätzen nicht nachweisbar.

3.5.4.2 Weizenkaff-Hydrolysat

Das hier verwendete Weizenkaff wurde einem Organosolv-Aufschluss unterzogen, um die Zugänglichkeit für die darauf folgende enzymatische Hydrolyse zu erhöhen [ANDERS 2013]. In der gewonnenen Hydrolysatlösung lag eine Gesamt-Zuckerkonzentration von 70-80 g/L vor, welche hauptsächlich Zucker wie Glucose (23 %), Xylose (18 %) und Arabinose (11 %) enthielten [ANDERS 2013].

Als Medienvarianten dienten A- und YA-Medium, welche in konzentrierter Form zum Weizenkaff-Hydrolysat zugegeben wurden. Die Inkubation von *C. spba.* mit jeweils 10-mL-Ansätzen fand bei 27 °C in 20-mL-Vials statt. Nachdem binnen 72 h nach Sichtung noch keine deutliche Trübung oder Gasbildung und damit auch kein Zellwachstum erkennbar war, wurde jeder Ansatz nochmals mit Reduktionsmittel versetzt (0,28 g/L L-Cystein-HCl) und mit frischer Vorkultur beimpft. Danach inkubierten die Ansätze unter täglicher Beobachtung für weitere 120 h, bevor die Endprobenahme erfolgte.

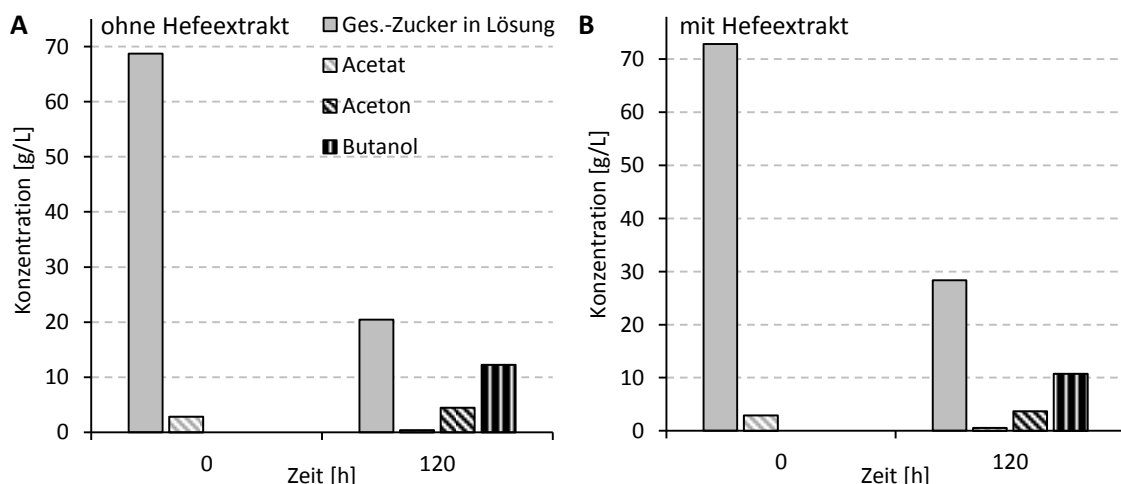


Abbildung 3.5.5: Zucker- und Produktkonzentrationen im Inkubationsversuch mit *C. spba.* in 10 mL A- (A) und YA-Medium (B) mit Weizenkaff-Hydrolysat als Substrat inkubiert bei 27 °C in 20-mL-Vials für 120 h. Start-pH-Wert: 6,2

Aus 48,2 g/L Zucker entstanden im Ansatz ohne Hefeextrakt (Abbildung 3.5.5 A) 4,5 g/L Aceton und 12,2 g/L Butanol was einer Butanolausbeute von 25 % entsprach. Die Acetatkonzentration sank dabei von 2,9 auf 0,4 g/L.

Die Zugabe von Hefeextrakt brachte keine Verbesserung der Produktausbeuten oder Endkonzentrationen (Abbildung 3.5.5 B). Bei einem Zuckerverbrauch von 44,6 g/L sind hier 3,7 g/L Aceton und 10,8 g/L Butanol gebildet worden. Die Acetatkonzentration nahm von 2,9 g/L auf 0,5 g/L ab. Die Butanolausbeute betrug hier 24 %.

Das vorbehandelte Weizenkaff-Hydrolysat konnte erfolgreich als Substrat eingesetzt werden. Es lieferte zum einen genügend verwertbare Zucker und zum anderen ausreichend Acetat, sodass keine zusätzliche Acetatquelle zugegeben werden musste. Die Endkonzentrationen und Ausbeuten für Butanol waren mit maximal 12,2 g/L und 25 % als Vialversuch, verglichen mit Reaktoransätzen, hoch (vgl. Abbildung 3.3.8, Seite 74). Im Reaktor sind unter optimierten Bedingungen (27 °C, 0,2-0,3 bar, 200 RPM) mit Weizenkaff-Hydrolysat höhere Konzentrationen als im Vialversuch zu erwarten.

3.5.4.3 Zuckerrübe

Zuckerrübe wurde als ein weiteres Rohsubstrat getestet, dafür zerkleinert, autoklaviert und in 50-mL-Vials mit A- oder YA-Medium auf 30 mL aufgefüllt. Die Konzentration an Zuckerrübe im Medium betrug dabei 100 g/L, wovon etwa 20 % als Gesamt-Zucker in Lösung vorlagen. Die Ansätze wurden mit *C. spba.* für 120 h bei 30 °C inkubiert.

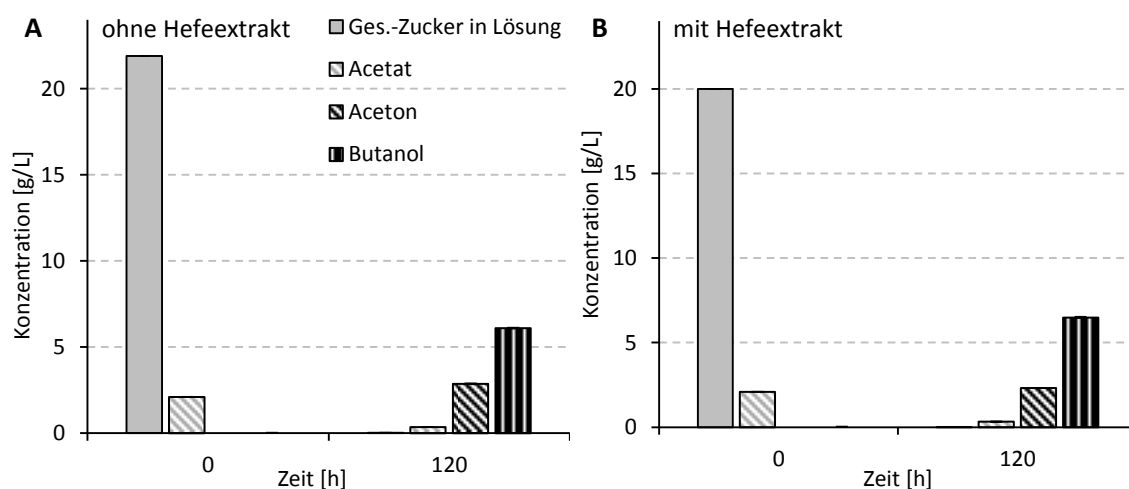


Abbildung 3.5.6: Gesamtzucker- und Produktkonzentrationen im Inkubationsversuch mit *C. spba.* in A- (A) und YA-Medium (B) mit 100 g/L Zuckerrübe als Substrat inkubiert bei 27 °C. 30 mL Ansätze in 50-mL-Vials. Start-pH-Wert: 6,2

Ergebnisse und Diskussion

Wie aus Abbildung 3.5.6 A entnommen werden kann, enthielt die Startprobe im Medienansatz ohne Hefeextrakt 21,9 g/L Gesamtzucker (Saccharose, Glucose, Galactose, Fructose) und 2,1 g/L Acetat in Lösung. Daraus entstanden 2,9 g/L Aceton und 6,1 g/L Butanol, was einem Butanolertrag von 28 % entsprach. Mit Hefeextrakt (Abbildung 3.5.6 B) konnten aus gelösten 20 g/L Gesamtzucker und 2,1 g/L Acetat 2,3 g/L Aceton und 6,5 g/L Butanol gebildet werden. Der Butanolertrag betrug hier 33 % und lag damit um 5 % höher als im Ansatz ohne Hefeextrakt. Zuckerrübe stellt, in Anbetracht der für *C. spba.* leicht zugänglichen Zucker und der guten Erträge, ein geeignetes Substrat für die Konversion zu Butanol dar. Bis auf eine Zerkleinerung der Zuckerrübe und 15 minütiges Erhitzen auf 121 °C gab es keine weitere Vorbehandlung für den Einsatz in der Fermentation mit *C. spba.*. Sogar ohne Hefeextrakt konnte im Vialversuch ein Butanolertrag von 28 % erreicht werden. Die in Lösung vorhandenen Zucker wurden in beiden Ansätzen vollständig verbraucht.

3.6 Induktion der Sporenbildung von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4

Der Test von Zuckerrübe als Substrat mit unterschiedlichen Hefeextrakt-Konzentrationen lieferte ein weiteres unerwartetes Ergebnis. In allen vorangegangenen Versuchen konnte keine Sporenbildung durch den hier verwendeten Stamm *C. saccharoperbutylacetonicum* N1-4 beobachtet werden. Auch durch die DSMZ wurde laut SPRING [2012] durch mikroskopische Untersuchung keine Sporenbildung von *C. spba.* N1-4 DSM 14923, inkubiert in DSMZ-Medium 104b (Tabelle 2.3.3, Seite 31), beobachtet. Eine Pasteurisierung mit anschließender Inkubation, als sicherer Beleg für die Abwesenheit von Sporen, wurde jedoch nicht durchgeführt [SPRING 2012].

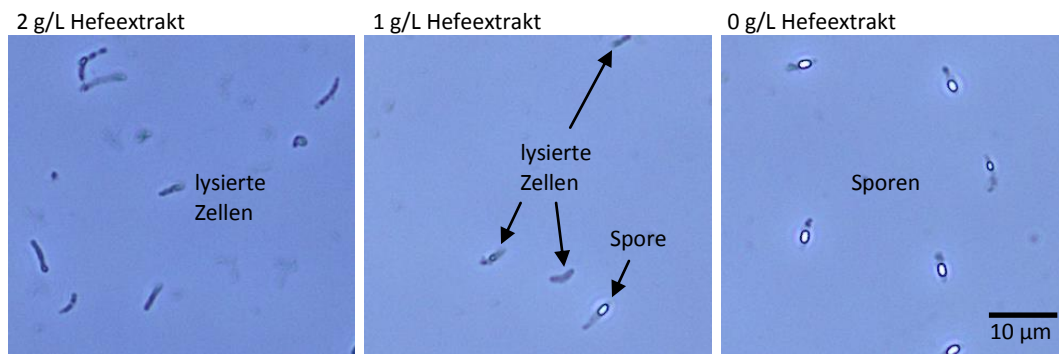


Abbildung 3.6.1: Zellmorphologie nach 20 Tagen von *C. spba.* aus Standkulturen in 20 mL YA-Medium mit unterschiedlichen Hefeextrakt-Konzentrationen (0 g/L; 1 g/L und 2 g/L) und 100 g/L Zuckerrübe. Phasenkontrastaufnahme, Zeiss Axioplan, 40er Objektiv, Ph2

Abbildung 3.6.1 zeigt die unterschiedliche Morphologie der Zellen in verschiedenen Medienansätzen mit Zuckerrübe nach 20 Inkubationstagen. Mit 2 g/L Hefeextrakt waren lysierte Zellen zu beobachten. Mit Abnahme der Hefeextrakt-Konzentration nahm die Anzahl der Sporen in den inaktiven Kulturen zu. Erst ohne Hefeextrakt lag die Mehrheit der Zellen als Sporen vor, welche unter dem Phasenkontrast-Mikroskop nachweisbar waren. Die Sporen wurden auf O₂-Toleranz und Hitzeeinwirkung (5 min bei 100 °C) getestet und keimten nach ca. 2 Tagen in YA-Glucose-Medium aus.

Durch die Sporen ist es möglich die bisher schwierige und unsichere Stammhaltungsstrategie zu ändern und eine Sporensuspension statt möglicherweise degenerierte Zellen aus Kryokulturen (-80 °C) für die Herstellung von Vorkulturen zu nutzen.

3.7 Langzeitfermentation als repeated-Batch

Ein Fermentationsversuch über mehr als 1000 Stunden (> 40 Tage) mit immobilisierten und freien Zellen im Vergleich sollte klären:

- ob die Zellen bei Butanolstress dauerhaft geschädigt werden oder sich in frischem Medium wieder erholen und wie zuvor weiter produzieren können.
- ob durch Immobilisierung die Prozessstabilität, Produktivität und Lösungsmittel-toleranz gegenüber freien Zellen gesteigert werden kann.
- welchen Einfluss die Acetatkonzentration auf das Produktspektrum hat.

In LentiKats® immobilisierte sowie freie Zellen wurden in einer Doppel-Fermentieranlage in 200-mL-Reaktoren mit je 125 mL YA-Medium und Glucose unter optimierten Bedingungen (27 °C, 0,2-0,3 bar, 300 RPM) inkubiert. Eine stärkere Rührung war hier notwendig, um die LentiKats® in Schwebelage zu halten. In den Batch-Ansätzen war stets ausreichend Glucose (50-80 g/L) vorhanden, um nicht in eine Substratlimitierung zu geraten. Die Probennahmen erfolgten zwei- bis dreimal pro Tag, wobei möglichst zeitnah die Konzentrationen der gelösten Substrate und Produkte ermittelt wurden. Um die Handhabung des Systems zu optimieren und die Zellen dabei weniger zu schädigen, erfolgte der Medienwechsel in den ersten sechs Durchgängen vor Erreichen der maximalen Butanol-Endkonzentration. Nachdem 11-12 g/L Butanol erreicht waren wurde die Fermentation gestoppt. Die nächsten vier Fermentationen liefen so lange, bis sich der pH-Wert stabilisierte (Abbildung 3.7.2 A, Seite 95) oder eine Gasbildung nicht mehr beobachtet werden konnte bzw. ein Großteil freier Zellen in Lyse überging (1. und 3. Batch, Abbildung 3.7.1). 5% der Zellkultur oder gewaschene LentiKats® (Kapitel 2.10.3, Seite 49) aus der vorigen Fermentation dienten jeweils als Inokulum für den darauf folgenden Batchversuch. Im zehnten Batch erfolgte eine Zugabe von etwa 23 g/L Glucose, um einer Substratlimitierung vorzubeugen.

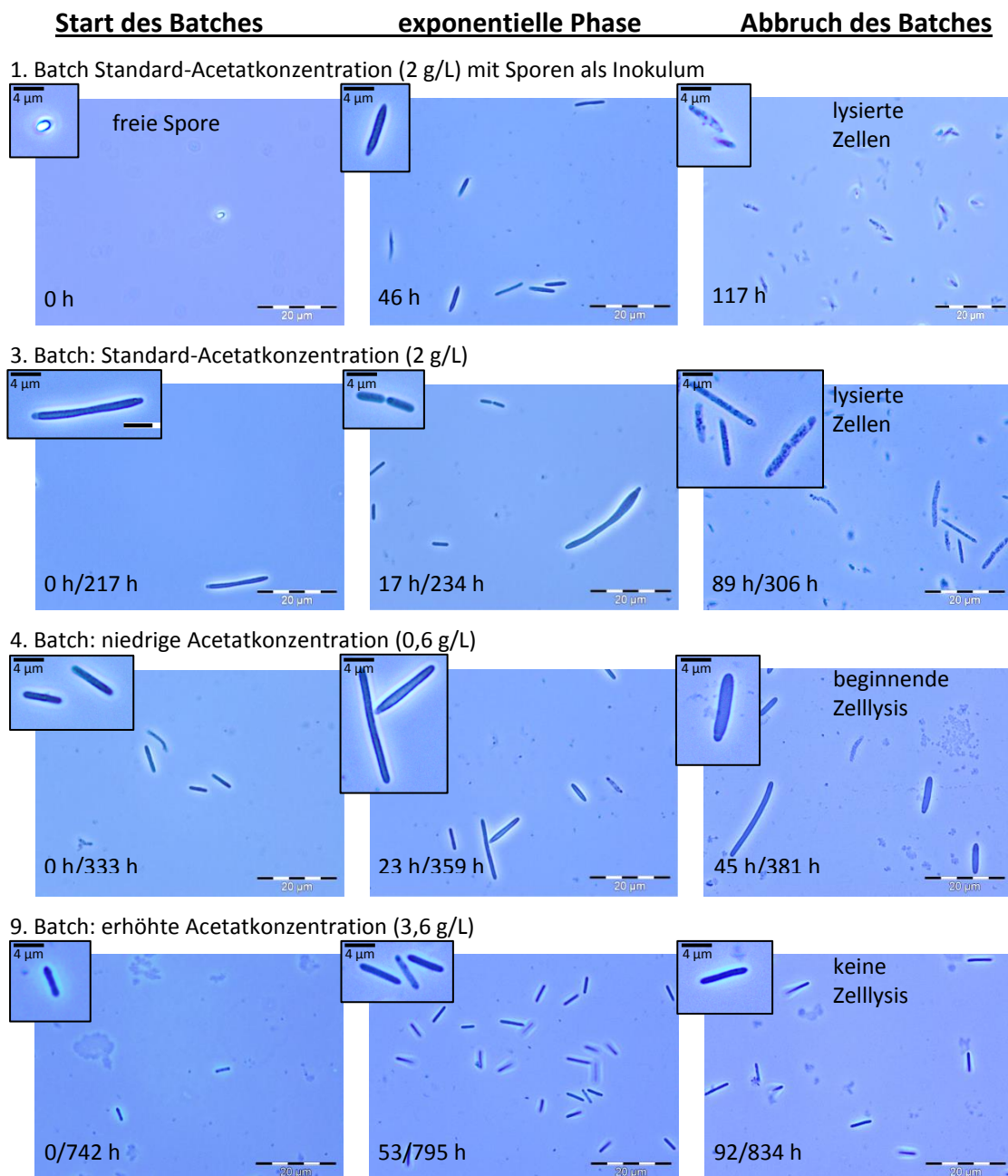


Abbildung 3.7.1: Morphologie von *C. spba.* in repeated-Batch-Fermentationen mit freien Zellen, zum Start des Batches, in exponentieller Phase und bei Abbruch des Batches, YA-Medium mit Glucose, bei 27 °C, 300 RPM und 0,2-0,3 bar; vergrößerte Ansicht ist eingerahmt (Messbalken=4 µm); Phasenkontrastaufnahme: Zeiss Axioplan, 100-fach Objektiv, Ph3, (Messbalken=20 µm), Inkubationszeit in Stunden (Batch/gesamter Versuch)

Während der Fermentationen konnten verschiedene Zellmorphologien beobachtet werden (Abbildung 3.7.1). Die Zellen hatten zu Beginn der Fermentationen wie auch in der exponentiellen Phase eine typische Größe von ~10 µm und waren kompakt und dunkel. Sie wiesen eine hohe Mobilität auf, welche mit fortschreitender Fermentationsdauer und damit auch steigender Lösungsmittelkonzentration nachließ. Es traten aber auch stark vergrößerte (~20 µm), keulig verdickte (Ø: 3 µm) Zellen auf,

Ergebnisse und Diskussion

welche etwas heller erschienen und sich träger bewegten als kompakte Zellen. In den ersten drei Durchgängen lysierten die Zellen zum Ende der Fermentation. Dies konnte jedoch nicht in allen darauf folgenden Fermentationen beobachtet werden. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Morphologie und der Acetat-Start- oder den Produktkonzentration konnte nicht festgestellt werden (vgl. Abbildung 6.4.2, Seite 126). Jedoch könnte eine Adaption der Zellen an die gebildeten Produkte zu einer verzögerten Zelllyse beigetragen haben (4. und 9. Batch, Abbildung 3.7.1), welche im späteren Verlauf des Versuches erst mit höheren Produktkonzentrationen (≥ 13 g/L) eintrat.

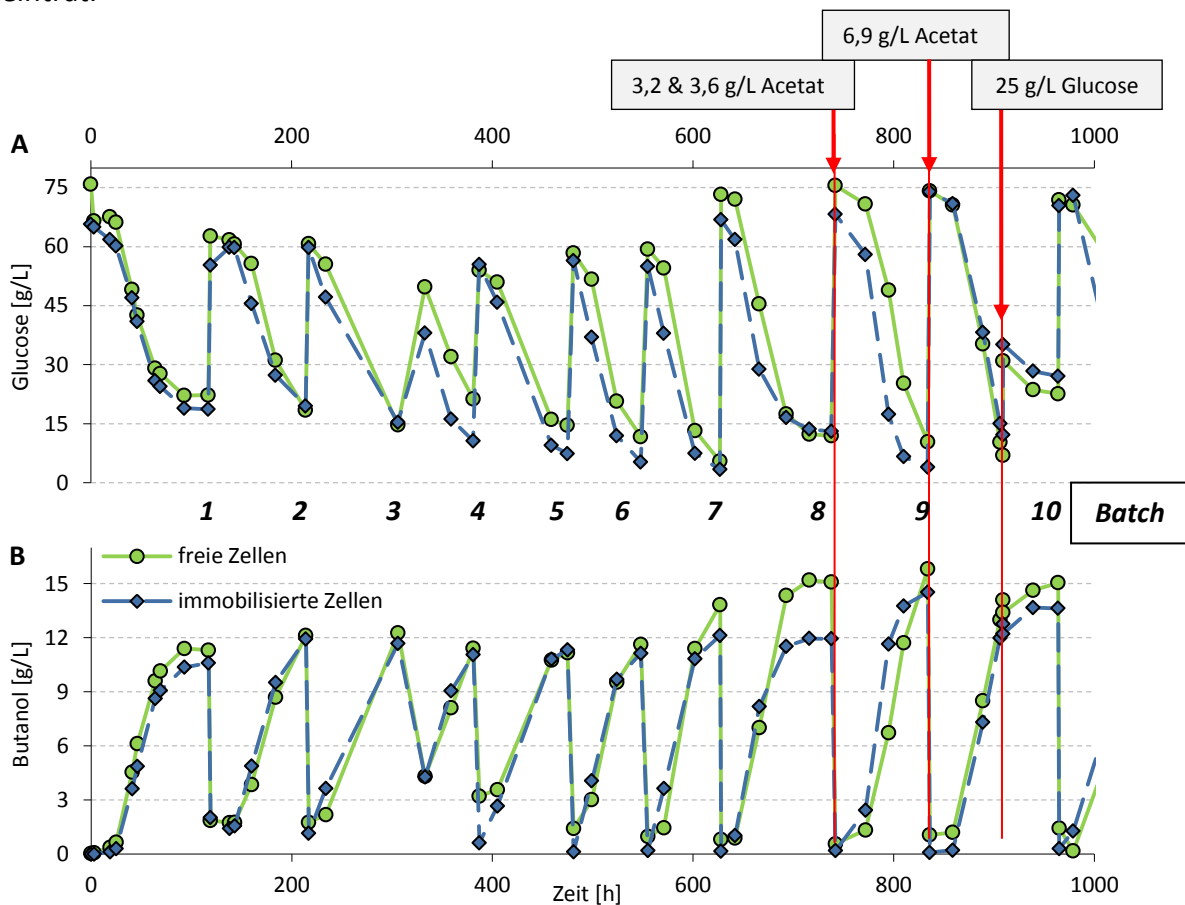


Abbildung 3.7.2: Zeitlicher Verlauf der Glucose- (A) und Butanolkonzentrationen (B) im Vergleich freier und immobilisierter Zellen. Repeated-Batch-Fermentation mit *C. spba.* in YA-Glucose-Medium, bei 27 °C, 300 RPM und 0,2-0,3 bar.

Nach einer Lag-Phase von 19 h startete die Butanolproduktion und bildete innerhalb weiterer 50 h 9-10 g/L Butanol (Abbildung 3.7.2 B), was einer Produktivität von $0,18-0,20 \text{ g(L}\cdot\text{h)}^{-1}$ entspricht. Nach insgesamt 117 h wurde die erste Fermentation durch Erneuern des Mediums abgebrochen und erreichte 10,6 g/L (immobilisierte Zellen) und 11,3 g/L (frei Zellen) Butanol.

Ergebnisse und Diskussion

Im ersten und ab dem 7. Batch konnten im Reaktor mit freien Zellen höhere Butanolkonzentrationen gemessen werden als mit immobilisierten Zellen. Ab dem 7. Batch wurde zudem die Fermentation nicht mehr vorzeitig abgebrochen, sodass höhere Endkonzentrationen erreicht werden konnten. Im 8. Batch wurden 3 g/L mehr Butanol im Reaktor mit freien Zellen (15 g/L Butanol) nachgewiesen als mit immobilisierten Zellen (12 g/L Butanol). Im Schnitt wurden mit freien Zellen $0,23 \text{ g}_{\text{Butanol}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$ und mit immobilisierten $0,22 \text{ g}_{\text{Butanol}}/\text{g}_{\text{Glucose}}$ gebildet, wobei durchschnittlich 85 h vergingen. Die innerhalb von 1000 h maximal erreichte Butanol-Endkonzentration betrug mit freien Zellen 15,8 g/L und mit Immobilisaten 14,5 g/L.

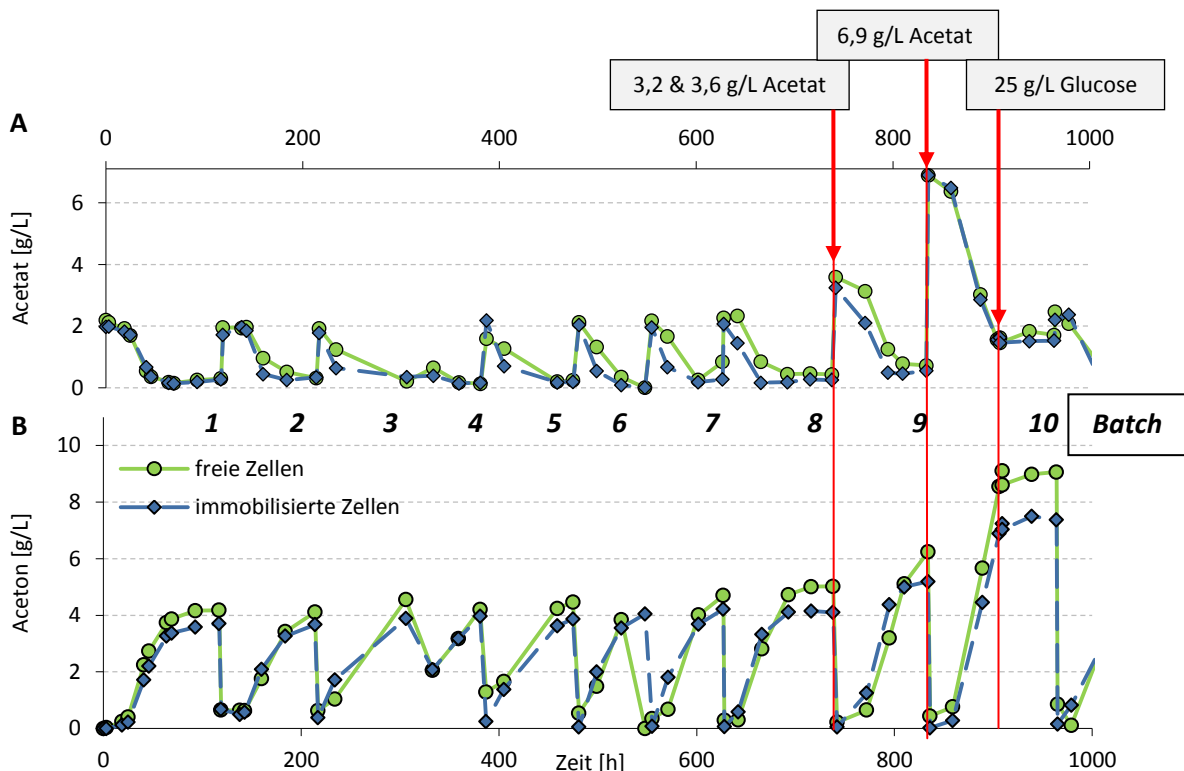


Abbildung 3.7.3: Zeitlicher Verlauf der Acetat-(A) und Acetonkonzentrationen (B) im Vergleich freier und immobilisierter Zellen. Repeated-Batch-Fermentation mit *C. spba.*-Zellen in YA-Glucose-Medium, bei 27 °C, 300 RPM und 0,2-0,3 bar.

In der Arbeit von CHEN & BLASCHEK [1999a] wurde gezeigt, dass Acetat einen wichtigen Einfluss auf die Produktbildung und Zellvitalität hat. Ohne Acetat konnte im Versuch unter Kapitel 3.3.4 (Seite 76) eine deutlich geringere Lösungsmittelbildung beobachtet werden.

Zum Ende jedes Batches mit freien Zellen waren meist etwas höhere Acetonkonzentrationen nachweisbar als mit immobilisierten Zellen. Abgesehen davon

Ergebnisse und Diskussion

steigerte sich die Acetonkonzentration mit der eingesetzten Acetatkonzentration in beiden Ansätzen (Abbildung 3.7.3). Die im YA-Medium standardmäßig vorhandenen Acetatkonzentrationen von 1,7-2,3 g/L ermöglichten Acetonkonzentrationen von 3,7-4,7 g/L. Eine reduzierte Acetatkonzentration im Medium von nur 0,4-0,6 g/L ließ nur eine Bildung von netto 2,1 g/L Aceton zu. Mit 3,2 g/L und 3,6 g/L Acetat entstanden 5,2 g/L bzw. 6,2 g/L Aceton durch immobilisierte bzw. freie Zellen. Die Zugabe von 6,9 g/L Acetat führte zu einem Anstieg der Acetonkonzentration auf 9,1 g/L (freie Zellen) und 7,5 g/L (Immobilisate).

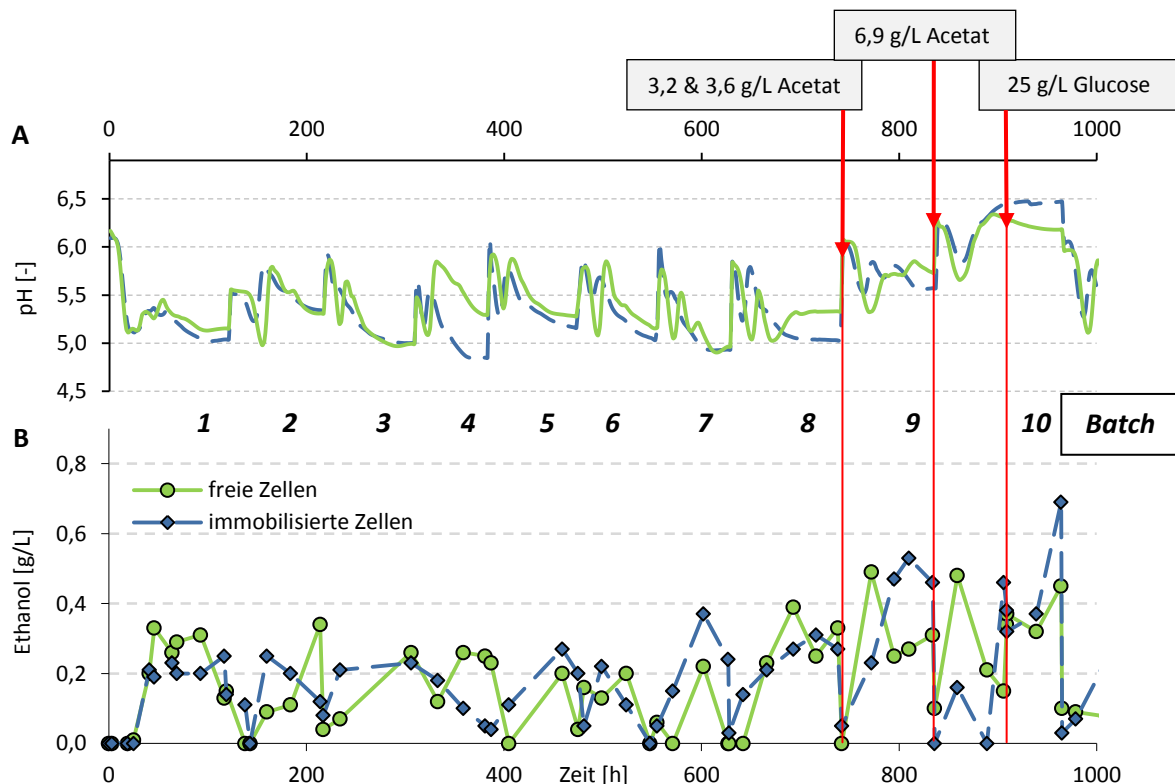


Abbildung 3.7.4: Zeitlicher Verlauf der pH-Werte (A) und der Ethanolkonzentrationen (B) im Vergleich freier und immobilisierter Zellen. Repeated-Batch-Fermentation mit *C. spba.*-Zellen in YA-Glucose-Medium, bei 27 °C, 300 RPM und 0,2-0,3 bar.

Nach einer kurzen Lag-Phase von 3 h sanken die pH-Werte in der Acidogenese innerhalb von insgesamt 17 h von 6,2 auf 5,2 ab. In der Solventogenese stiegen die pH-Werte mit Schwankungen in 50 h auf 5,4 an und fielen nachfolgend auf 5,1 (freie Zellen) bzw. 5 (immobilisierte Zellen) ab (Abbildung 3.7.4 A). Die pH-Wert-Verläufe zeigten in jedem Batch das gleiche Muster, jedoch mit unterschiedlich starker Ausprägung von Lag-Phase, Fermentationsdauer und pH-Wert-Maxima. Als niedrigster pH-Wert wurde 4,8 mit immobilisierten Zellen im vierten Batch gemessen. Der höchste pH-Wert von 6,5 konnte ebenfalls mit immobilisierten Zellen im 10. Batch ermittelt werden. Verglichen mit freien Zellen lief die Änderung des pH-Wertes mit

immobilisierten Zellen schneller ab und erreichte, mit Ausnahme des 10. Batches, vor Abbruch jeder Fermentation die niedrigeren pH-Werte. Aus den pH-Werten ließ sich leider kein direkter Zusammenhang auf Produktbildung oder Produktkonzentrationen ableiten, obwohl von einem höheren End-pH-Wert auf eine bessere Umsetzung der Säuren zu Lösungsmitteln geschlossen werden kann.

Die Ethanol-Endkonzentrationen bewegten sich auf einem niedrigen Niveau zwischen 0,2 g/L und 0,7 g/L (Abbildung 3.7.4 B). Auf Ethanol als Endprodukt wird, wegen des sehr geringen Anteils von unter 1 g/L nicht näher eingegangen.

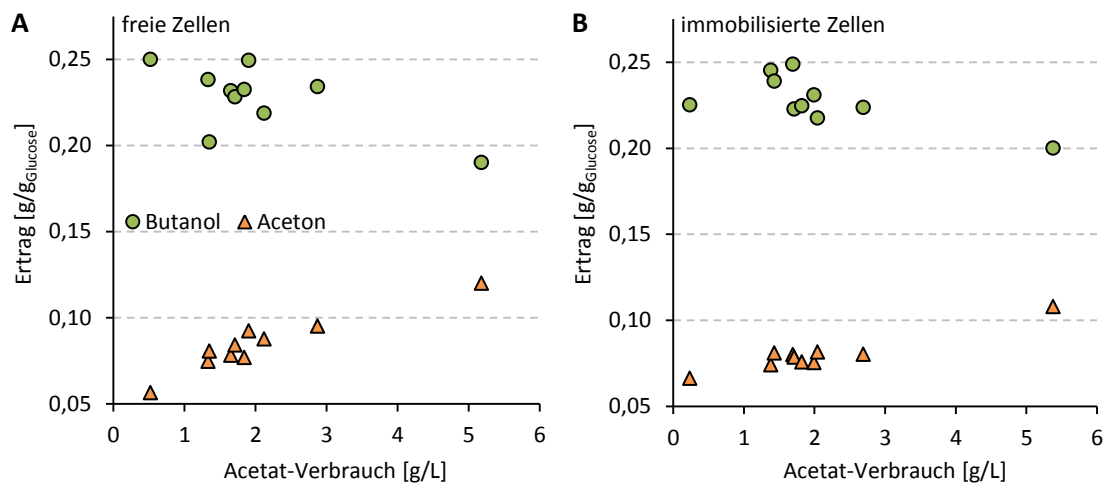


Abbildung 3.7.5: Aceton- und Butanolerträge in Abhängigkeit vom Acetatverbrauch aus den repeated-Batch-Fermentationen des Langzeitversuchs mit freien (A) und immobilisierten (B) *C. spba.* Zellen in YA-Glucose-Medium, bei 27 °C, 300 RPM und 0,2-0,3 bar.

Abbildung 3.7.5 zeigt den Aceton- und Butanolertrag in Abhängigkeit vom Acetatverbrauch. Daraus wird ersichtlich, dass bei einem höheren Acetatverbrauch auch mehr Aceton pro Gramm Glucose gebildet wurde. Der Butanolertrag fiel hingegen mit steigendem Acetatverbrauch und verhielt sich damit gegenläufig zum Acetonertrag. Mit freien Zellen war der Effekt von Acetat auf die Produktbildung stärker ausgeprägt als mit immobilisierten Zellen. Für *C. acetobutylicum* konnte gezeigt werden, dass nicht glucoselimitierte Kulturen bei Acetatzugabe ebenfalls vermehrt Aceton bilden (4,2 g/L → 10,1 g/L), die Butanolbildung (14,8 g/L → 15,1 g/L) aber nicht beeinflusst wurde [MATTA-EL-AMOURI ET AL. 1985]. Mit *C. spba.* kann ein hoher Butanolanteil durch eine verhältnismäßig geringe Zugabe an Acetat erreicht werden. Trotzdem zählt Acetat für den ABE-Prozess zu den wichtigen Bestandteilen des Mediums, wie aus Kapitel 3.3.4, Seite 76 sowie aus Arbeiten mit *C. beijerinckii* [CHEN &

BLASCHEK 1999a; CHEN & BLASCHEK 1999b] deutlich wurde. Da ein möglichst geringer Acetonanteil im Produktspektrum angestrebt wird, ohne Acetat aber kaum Lösungsmittel gebildet werden, wurde unter Verwendung von Abbildung 3.7.2, Seite 95 und Abbildung 3.7.3, Seite 96 eine optimale Acetat-Startkonzentration für *C. spba.* abgeschätzt. Mit einer vorgelegten Acetatkonzentration von 2,3 g/L konnten in diesem Versuch 15 g/L Butanol und 5 g/L Aceton mit freien Zellen erreicht werden, was einem Butanol : Aceton-Verhältnis von 3 : 1 entspricht.

Trotz der Konzentrationsunterschiede im ersten sowie im 7. bis 10. Durchgang verlief die Bildung der Produkte Aceton und Butanol mit freien und immobilisierten Zellen von 120 h bis 550 h parallel zueinander (Abbildung 3.7.2, Seite 95). Es konnte gezeigt werden, dass die Zellen mit dieser wiederholten Batch-Strategie immer wieder erneut wachsen und produzieren konnten und nicht dauerhaft durch Butanolstress (bis 16 g/L) geschädigt wurden. Im Ansatz mit freien Zellen war der Fermentationsverlauf jedoch stark abhängig von der Anzahl und Fitness der restlichen überlebenden Zellen aus der Vorgänger-Fermentation. Dort wurden 10 mL der alten Kulturbrühe als Inokulum genutzt. Die Zellen scheinen sich mit fortschreitender Anzahl der Fermentationen an ihre Umweltbedingungen zu adaptieren. Im Verlauf des Langzeitversuches lysierten immer weniger Zellen zum Ende einer Fermentation, bzw. erst bei höheren Produktkonzentrationen und zeigten morphologische Veränderungen (Abbildung 3.7.1, Seite 94). Die Zelldichte lag im Ansatz mit LentiKats® zu Beginn des Versuches bei 50 % der Zelldichte mit freien Zellen. Diese stieg aber im Verlauf immer weiter an (siehe Anhang Abbildung 6.4.1, Seite 125). Die freien Zellen im Ansatz mit LentiKats® trugen demnach einen Großteil an der Produktbildung bei.

Durch Immobilisierung der Zellen und deren Inkubation war keine signifikante Zunahme der Produktivität oder Lösungsmitteltoleranz erkennbar. Vorteil der Immobilisierung durch LentiKats® war vor allem eine erleichterte Handhabung beim Medienwechsel. Hier konnte die gesamte Fermentationsbrühe durch Waschen aus dem Reaktor entfernt werden, was eine Verschleppung von Produkten aus der vorigen Fermentation reduzierte.

Die vorgelegte Acetatkonzentration beeinflusst das Produktspektrum entscheidend. Acetonbildung und -ertrag nahmen mit steigendem Acetatverbrauch zu. Der Butanol-ertrag verhielt sich dagegen umgekehrt proportional zum Acetatverbrauch (Abbildung

3.7.5). Ohne Acetatzugabe ist jedoch kaum Produktbildung möglich (vgl. Abbildung 3.3.9, Seite 76). Um den Acetonanteil möglichst gering zu halten aber dennoch Butanolkonzentrationen im Bereich von 15 g/L zu erreichen erwies sich für *C. spba.* eine Acetatkonzentration im Bereich von 2,3 g/L als optimal.

3.8 *in situ*-flüssig-flüssig-Extraktion der Endprodukte

Ein Hauptproblem des ABE-Prozesses ist die geringe Produkt-Endkonzentration, bedingt durch die Toxizität des Endproduktes Butanol. Durch eine kontinuierliche Abführung der Endprodukte mittels Extraktion könnte das Problem umgangen werden [ROFFLER ET AL. 1988; TANAKA ET AL. 2012], da die Zellen nicht mehr höheren Butanolkonzentrationen von über 15 g/L ausgesetzt wären. Dazu war es notwendig, ein geeignetes Extraktionsmittel zu finden, welches gegenüber *C. spba.* nicht toxisch ist und einen angemessenen Verteilungskoeffizienten (Extraktionsmittel/Wasser) für Butanol ($k_{E/W}$) besitzt. Es sollte sich nicht mit Wasser mischen lassen, bei Raumtemperatur flüssig bleiben und, für die spätere Abtrennung des Butanols, einen höheren Siedepunkt als 118 °C aufweisen. Der $k_{E/W}$ für Butanol sollte einen Wert von mindestens drei aufweisen, damit möglichst viel Butanol aus der Fermentationsbrühe in die organische Phase über geht, um im Medium eine geringe Butanolkonzentration zu erhalten.

3.8.1 Extraktionsmitteltest mit *C. saccharoperbutylacetonicum* für die *in situ*-flüssig-flüssig-Extraktion

In Vorversuchen sind die Verteilungskoeffizienten ($k_{B/W}$) möglicher Extraktionsmittel mit Wasser untersucht worden [HELLERT 2013]. Daraufhin erfolgte ein Test zur Aufklärung der Toleranz des Fermentationsstammes gegenüber diesen Extraktionsmitteln. Auf dessen Grundlage wurde ein geeignetes Extraktionsmittel für noch folgende Fermentationsversuche ausgewählt.

In 20-mL-Vials wurden jeweils 5 mL TYA-Medium, welches 10 g/L Glucose enthielt, mit 5 mL Extraktionsmittel überschichtet und für 5 Sekunden stark von Hand geschüttelt, um wasserlösliche Bestandteile schneller in Lösung zu bringen. Durch die starke Durchmischung entstand eine Medium-Extraktionsmittel-Emulsion. Nach vollständiger Phasentrennung (über Nacht) wurde mit 0,5 mL Vorkultur ohne direkten Kontakt zum

Ergebnisse und Diskussion

Extraktionsmittel inokuliert. Die Inkubation der Kulturen erfolgte ohne Durchmischung bei 27 °C für mindestens 14 Tage. Eine Trübung des Mediums sowie die Kontrolle unter dem Mikroskop dienten als Wachstumsnachweis.

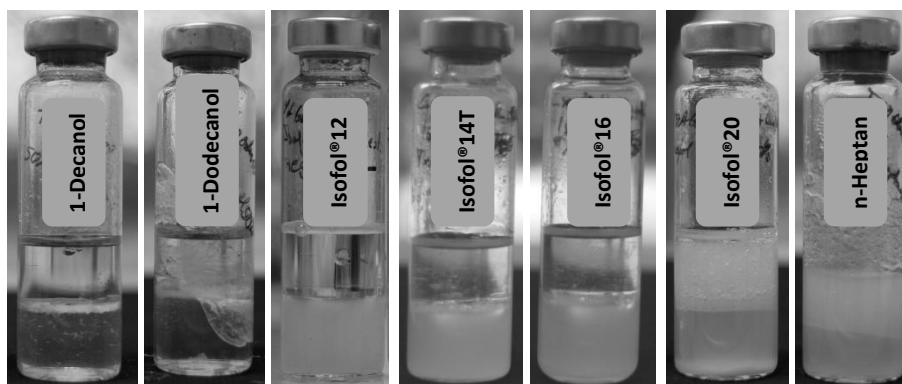


Abbildung 3.8.1: Vials des Toxizitätstests mit je 5 mL TYA-Medium und 10 g/L Glucose, überschichtet mit jeweils 5 mL Extraktionsmittel, inkubiert bei 27 °C für mindestens 14 Tage.

In Abbildung 3.8.1 sind die über 14 Tage inkubierten Vialansätze mit TYA-Glucose-Medium und dem jeweiligen Extraktionsmittel zu sehen. In den Ansätzen mit n-Heptan und Alkoholen der SASOL Germany GmbH wie Isofol®12, Isofol®14T, Isofol®16 und Isofol®20 war ein Zellwachstum als Trübung zu erkennen. Mit Isofol®20 und n-Heptan konnten sich die Phasen nicht mehr vollständig trennen, was zu einer dauerhaften Emulsionsbildung führte.

Tabelle 3.8.1: Verteilungskoeffizienten ($k_{E/W}$) von Butanol in dem jeweiligen Extraktionsmittel und H₂O bzw. einer synthetischen Medienlösung (sML) (siehe Tabelle 6.3.1, Seite 125) bei 25 °C sowie dem Wachstum von *C. spba.* unter Einfluss des Extraktionsmittels in 5 mL TYA-Glucose-Medium bei 27 °C in 20-mL-Vials

| Extraktionsmittel 50 Vol % | $k_{E/W}$ [HELLERT 2013] | $k_{E/W}$ (Literatur) | Wachstum |
|-------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|----------|
| 1-Decanol | 9,3 (H ₂ O) | 6,2 [EVANS & WANG 1988a] | - |
| 1-Dodecanol (fest <25°C) | n.d. | 5,1-5,5 [EVANS & WANG 1988b] | - |
| Isofol®12 (2-Butyloctan-1-ol) | 4,3 (H ₂ O) 5,0 (sML) | - | + |
| Isofol®14T (siehe Seite 2) | 3,5 (H ₂ O) | - | + |
| Isofol®16 (2-Hexyldecanol) | 2,9 (H ₂ O) | 4,5 [KIM ET AL. 1999] | + |
| Isofol®20 (2-Octyldodecanol) | n.d. | 3,5 [BARROS ET AL. 1987] | + |
| n-Heptan | 0,2 (H ₂ O) | - | + |

Tabelle 3.8.1 zeigt die auf Toxizität getesteten Extraktionsmittel mit deren bei 25 °C ermittelten oder aus der Literatur recherchierten Verteilungskoeffizienten sowie den Ergebnissen des Toxizitätstest bei 27 °C. Daraus geht hervor, dass 1-Decanol zwar sehr gut für die Extraktion von Butanol geeignet ist aber leider wachstumshemmend auf *C. spba.* wirkt. 1-Dodecanol wird in der Literatur [EVANS & WANG 1988b] ebenfalls als gutes Extraktionsmittel für Butanol beschrieben, hatte jedoch gleich zwei Nachteile. Zum Einen konnte auch hier im Toxizitätstest mit *C. spba.* kein Zellwachstum festgestellt werden, zum Anderen nimmt 1-Dodecanol bei 24 °C einen festen Aggregatzustand an, was für eine technische Nutzung aufgrund der Verstopfungsgefahr in Leitungen ungünstig ist. Alle anderen getesteten Extraktionsmittel zeigten keine wachstumshemmende Wirkung auf *C. spba.*. Die verschiedenen Verteilungskoeffizienten der jeweiligen Extraktionsmittel in Tabelle 3.8.1 kommen unter anderem durch unterschiedliche Versuchsbedingungen wie z.B. bei Temperatur, pH-Wert oder Medienzusammensetzung zustande.

Da Isofol®12 (2-Butyloctan-1-ol) unter den getesteten Extraktionsmitteln den höchsten Verteilungskoeffizienten besitzt wurde mit YA-Medium und Isofol®12 der Inkubationsversuch nochmals wiederholt. Auch ohne Trypton konnte in diesem Ansatz Wachstum durch Trübung beobachtet werden. 2-Butyloctan-1-ol ist ein verzweigter C-12 Guerbet-Alkohol, der im Vergleich zu linearen Alkoholen mit gleicher Kettenlänge eine geringere Viskosität (~23, bei 20 °C) besitzt und zudem einen niedrigeren Schmelzpunkt (< -30 °C) aufweist [SASOL 2011]. Der Siedepunkt liegt bei 145 °C. Isofol®12 wurde hier als am besten geeignetstes Extraktionsmittel ausgewählt, da es das Wachstum von *C. spba.* nicht nennenswert beeinträchtigte und zudem einen hohen Verteilungskoeffizienten mit einer synthetischen Medienlösung von bis zu 5 aufwies (Tabelle 3.8.1). Isofol®12 wurde in einem späteren Reaktorversuch für die Extraktion von Butanol aus der wässrigen Phase genutzt, um die Endprodukthemmung im ABE-Prozess zu verringern.

Nach persönlicher Anmerkung von Herrn JAEGER [2013] können in Isofol®12, mit einer Reinheit von 97 %, schwach wasserlösliche Verunreinigungen mit potentiell hemmender Wirkung auf die Zellen enthalten sein. Dazu gehören Substanzen wie n-Hexanol, n-Octanol, 2-Propylheptanol, 5-Methyl-4-octanol oder 4-Methyl-5-Decanol.

Wie aus den Ergebnissen der Wachstumsversuche (Tabelle 3.8.1) zu entnehmen ist, hatten Verunreinigungen in Isofol®12 keinen erkennbaren Einfluss auf *C. spba.*.

3.8.2 Auswirkungen der Glucose-Startkonzentration auf die Butanolproduktion

In Reaktorversuchen werden möglichst hohe Substratkonzentrationen zu Beginn der Fermentation angestrebt, um eine Störung durch spätere Substratzugabe bei Substratlimitierung zu verhindern. Hohe Zuckerkonzentrationen können jedoch hemmend auf das Wachstum von Clostridien und somit auch auf die Produktbildung wirken [EZEJI ET AL. 2004]. In einem Vorversuch wurde der Einfluss unterschiedlicher Glucose-Startkonzentrationen auf die Butanolproduktion untersucht.

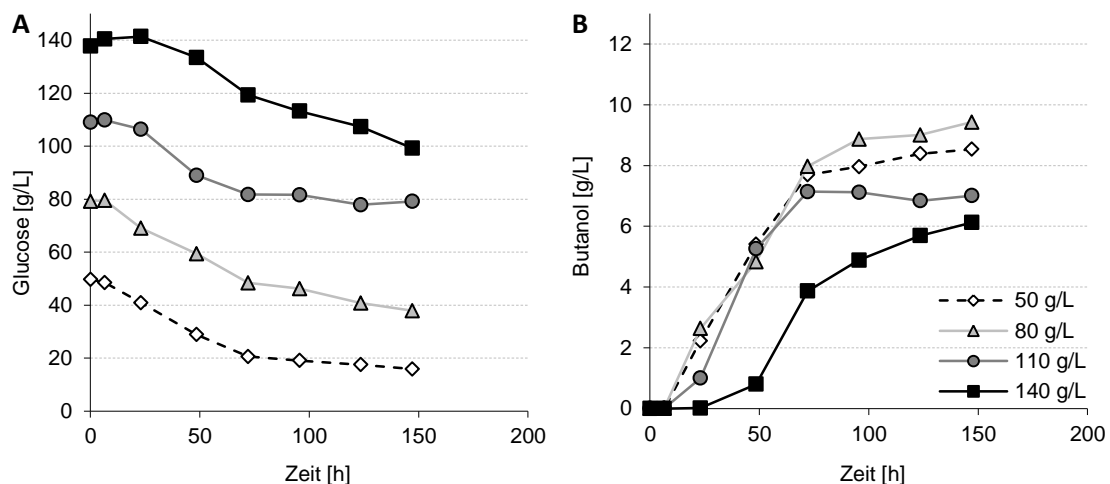


Abbildung 3.8.2: Verläufe der Glucose- und Butanolkonzentrationen in 50-mL-Vials mit 30 mL YA-Medium und verschiedenen Glucose-Startkonzentrationen in 147 h bei 30 °C

Die in Abbildung 3.8.2 dargestellten Substrat- (A) und Butanolkonzentrationen (B) zeigten unterschiedliche Verläufe in den vier Ansätzen. Mit einer 50 g/L Glucose-Startkonzentration waren nach 6 h 1,2 g/L verbraucht, wogegen mit 80 g/L Glucose nach dieser Zeit noch keine Abnahme der Substratkonzentration zu verzeichnen war. Nach 23 h verbrauchte *C. spba.* 3,5 g/L von den zu Beginn vorliegenden knapp 110 g/L Glucose. Bei einer Startkonzentration von 140 g/L Glucose bedurfte es sogar 48 h, um etwa 6 g/L zu verwerten. Je geringer die Glucosekonzentration im Ansatz war, desto kürzer war die Lagphase.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3.8.2: Ergebnisparameter bei verschiedenen Glucose-Startkonzentrationen in 50-mL-Vials mit 30 mL YA-Medium nach 147 h bei 30 °C, Höchstwerte fettgedruckt

| Glukose-Startkonzentration [g/L] | 50 | 80 | 110 | 140 |
|--|-----------|------------|-------------|------|
| Glukoseverbrauch [g/L] | 34 | 42 | 31 | 41 |
| Butanolkonzentration [g/L] | 8,5 | 9,4 | 7,0 | 6,1 |
| Ertrag [%] | 25 | 22 | 23 | 15 |
| Max.-Produktivität [g(L·h) ⁻¹] | 0,13 | 0,16 | 0,17 | 0,13 |

Mit niedrigeren Glucose-Startkonzentrationen von 50 g/L oder 80 g/L konnten nach 147 h mit 8,5 g/L und 9,4 g/L höhere Butanolkonzentrationen erreicht werden als mit 110 g/L oder 140 g/L Glucose (7,0 g/L und 6,1 g/L Butanol). Mit 50 g/L Glucose-Startkonzentration lag zudem der Butanolertrag, im Vergleich zum Ansatz mit 140 g/L Glucose, um 10 % höher (Tabelle 3.8.2). Die höchsten Produktivitäten von 0,16 g(L·h)⁻¹ und 0,17 g(L·h)⁻¹ wurden mit Glucose-Startkonzentrationen von 80 g/L und 110 g/L erzielt. Mit 80 g/L wurde aber auch der größte Glukoseverbrauch ermittelt.

Eine zu hohe Glucose-Startkonzentration von 140 g/L hatte einen negativen Einfluss auf Lagphase, Produkt-Endkonzentration, Ertrag und Produktivität. Die optimale Glucose-Startkonzentration liegt zwischen 80 g/L und 110 g/L, da in Reaktorversuchen mit unter 80 g/L Glucose die Gefahr einer schnell eintretenden Substratlimitierung besteht und bei 140 g/L bereits eine deutliche Verlängerung der Lag-Phase und damit eine Hemmung des ABE-Prozesses zu beobachten war. Folgende Reaktorversuche wurden daher mit Glucose-Startkonzentrationen zwischen 80-110 g/L angesetzt und im Fed-Batch weitergeführt. EZEJI ET AL. [2004] zeigten mit *C. beijerinckii* BA101, dass mit einer Substratkonzentration von 162 g/L die Lag-Phase auf etwa 40 h verlängerte.

3.8.3 Fermentation mit *in situ*-flüssig-flüssig-Extraktion (Isofol®12)

Den Abschluss dieser Arbeit stellte eine 2-Phasen-Fed-Batch-Fermentation mit wässriger (YA-Medium) und organischer Phase (Isofol®12) dar, wodurch die Butanoltoxizität mittels *in situ*-flüssig-flüssig-Extraktion der Lösungsmittel umgangen werden sollte. Um eine Verfügbarkeit der gebildeten Gase auch nach der Einleitung des Extraktionsmittels sicher zu stellen wurde eine zusätzliche Gasumwälzung in

Reaktor **B** installiert (Abbildung 3.8.4, Seite 109). In den Glasreaktoren wurden *C. spba.* in 600 mL YA-Medium mit 90 g/L Glucose inkubiert, bis nach 65 h eine Butanolkonzentration von knapp 9 g/L (**A**) bzw. 10 g/L (**B**) erreicht wurde. Nun wurde die Kulturbrühe mit 900 mL Isofol®12 zur Extraktion überschichtet. Bei geringen Acetatkonzentrationen (< 0,5 g/L) wurde YA-Medium (67 h, 124 h, 145 h, 261 h) bzw. A-Medium (189 h, 214 h) als konzentrierte Lösung zugegeben. Bei der Gefahr einer Substratlimitierung erfolgte die Zugabe einer konzentrierten Glucoselösung (168 h, 213 h, 261 h).

3.8.3.1 Fermentation ohne Gasumwälzung

In Abbildung 3.8.3 sind die gemessenen Fermentationsparameter und Konzentrationen der Fermentation mit *in situ*-flüssig-flüssig-Extraktion, ohne Gasumwälzung dargestellt. Nach einer kurzen Lag-Phase von 2 h begann der pH-Wert mit der Bildung von Butyrat zu sinken (Abbildung 3.8.3 A, B). Mit Erreichen des geringsten pH-Wertes von 4,9 nach 18 h setzte die solventogene Phase ein. Die Butyratkonzentration nahm auf 0,1-0,2 g/L ab (Abbildung 3.8.3 B), während der pH-Wert nach 32 h wieder bis auf 5,3 anstieg und nach 44 h wieder auf 5,1 abfiel. Der pH-Wert stieg nun bis zum Ende auf 6 an, wobei nach Medien- oder Acetatzugabe ein leichter pH-Wert-Anstieg zu verzeichnen war. Der Verbrauch von Glucose und Acetat nahm mit der OD₅₃₅ zu, welche nach 67 h das erste Mal ein Maximum von 9,4 erreichte, hinterher aber wieder einbrach. Nach 93 h lag die OD₅₃₅ bei 5,4 und erreichte nach 163 h wieder 9,4. Bis 305 h sank die OD₅₃₅ auf 5,2 ab. Nach 305 h wurde die Rührerdrehzahl auf 400 RPM erhöht, um abgesetzte Zellen in Suspension zu bringen, wodurch die OD₅₃₅ nach 331 h auf 6,1 anstieg.

Das Zuführen konzentrierter Medienlösungen (YA- oder A-Medium) konnte durch einen Anstieg der Acetatkonzentration bei 67 h, 124 h, 145 h, 189 h, 214 h und 261 h dokumentiert werden (Abbildung 3.8.3 B). Die Zugabe der Medienlösungen ergab eine Acetatkonzentration von gut 2 g/L nach den ersten drei Zugabezeitpunkten sowie gut 1 g/L bei den letzten drei Zugabezeitpunkten.

Ergebnisse und Diskussion

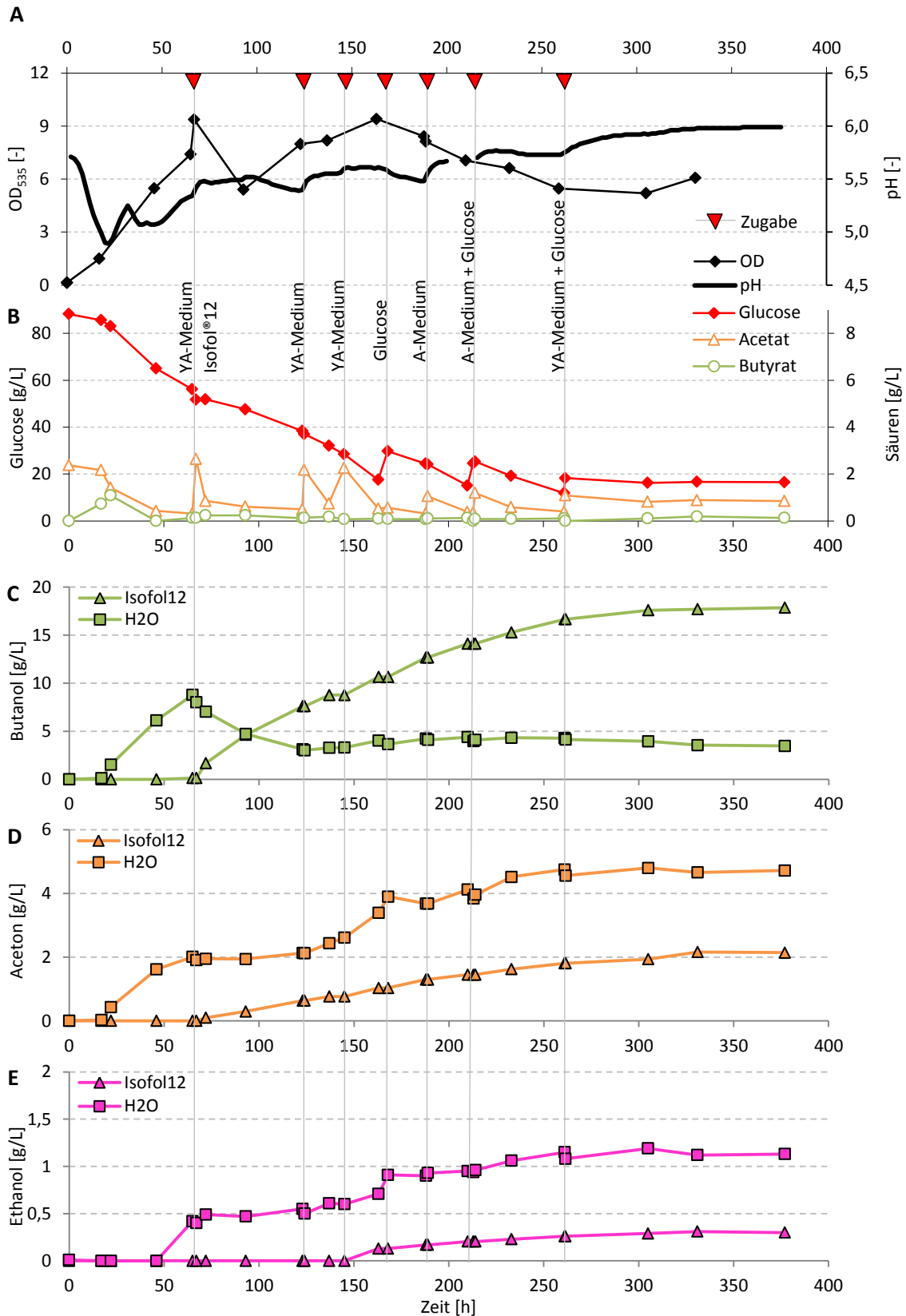


Abbildung 3.8.3: Zeitliche Verläufe von pH-Wert und OD₅₃₅ (A), Glucose- und Säurekonzentrationen (B) sowie den Konzentrationen von Butanol (C), Aceton (D) und Ethanol (E) in wässriger (□) und organischer (Δ) Phase aus der 2-Phasen-Fed-Batch-Fermentation ohne Gasumwälzung, mit YA-Glucose-Medium und Isofol®12 als Extraktionsmittel, bei 26 °C, 0,2-0,3 bar Überdruck, 200 RPM, Start-pH-Wert: 5,7 ungeregelt; (▼) Zugabe von Medium, Isofol®12 oder Substrat

17 h nach Start der Fermentation begann, mit Einsetzen der solventogenen Phase, die Lösungsmittelbildung (Abbildung 3.8.3 C, D). Nach 65 h wurden 8,8 g/L Butanol, 2 g/L Aceton und 0,4 g/L Ethanol erreicht, was einem A:B:E-Verhältnis von 5:22:1 entspricht. Die Einleitung des Extraktionsmittels (900 mL Isofol®12) führte zu einem sofortigen Absinken der Butanolkonzentration in der wässrigen Phase (600 mL YA-Medium) und einem Anstieg der Butanolkonzentration in der organischen Phase. Nach 123 h erreichte Butanol im Medium eine Konzentration von 3,1 g/L, stieg bis 210 h wieder auf 4,4 g/L an und erreichte nach 377 h 3,5 g/L. Die stetige Zunahme der Butanolkonzentration in der organischen Phase begann nach 65 h und wuchs innerhalb von 377 h auf 17,8 g/L an (Abbildung 3.8.3 C). In diesem Versuch bei 26 °C betrug der Verteilungskoeffizient ($k_{E/W}$) für Butanol in Isofol®12 und Kulturbrühe 5. In einer Untersuchung mit einer Modelllösung (Tabelle 6.3.1, Seite 125) konnte bei 25 °C und einem pH-Wert von 6 ebenfalls ein Verteilungskoeffizient von 5 ermittelt werden [HELLERT 2013].

Bei Aceton und Ethanol verringerte sich mit Zugabe des Extraktionsmittels der Anstieg der Konzentrationsverläufe im Medium (Abbildung 3.8.3 D, E). Aceton erreichte in der wässrigen Phase eine Konzentration von 4,7 g/L und ging mit bis zu 2,1 g/L in das Extraktionsmittel über. Dies entspricht einem $k_{E/W}$ für Aceton in Isofol®12 und Kulturbrühe von 0,45. Ethanol erreichte nur eine geringe Konzentration von 1,1 g/L in Kulturbrühe und ging auch nur mit 0,3 g/L in Isofol®12 über, was einem $k_{E/W}$ von 0,27 entsprach.

Isofol®12 besitzt einen hohen Verteilungskoeffizienten ($k_{E/W}=5$) und eine hohe Selektivität für Butanol, da die Verteilungskoeffizienten der Endprodukte Aceton und Ethanol mit unter 0,5 gering ausfielen. Somit geht von den gebildeten Lösungsmitteln hauptsächlich Butanol in die organische Phase über. Isofol®12 wirkte nicht toxisch auf *C. spba.*, lässt sich nicht mit H₂O mischen, bleibt bis -30 °C flüssig und besitzt mit 145 °C [SASOL 2011] einen höheren Siedepunkt als Butanol (118 °C). Es erfüllt somit alle Anforderungen an ein geeignetes Extraktionsmittel für die Butanolfermentation.

Da die maximale Hemmkonzentration von Butanol für *C. spba.* bei 15 g/L liegt (Kapitel 3.4, Seite 81), wären mit diesem Extraktionsmittel mit einem $k_{E/W}$ von 5 theoretisch Konzentrationen von bis zu 75 g/L in der organischen Phase möglich. Dazu müssten die Zellen in der wässrigen Phase eine Konzentration von 15 g/L erreichen, was in dieser

Arbeit in Fermentationen ohne *in situ*-Produktabtrennung wiederholt gezeigt werden konnte (Abbildung 3.7.2, Seite 95). Obwohl keine Sporulation eintrat, ausreichend Substrate und Salze zur Verfügung standen und die ABE-Konzentrationen in Kultur, nach Zugabe von Isofol®12, weit unterhalb der maximalen Hemmkonzentration lagen stagnierte die Lösungsmittelbildung. Die erwarteten Konzentrationen von bis zu 75 g/L in der organischen Phase wurden nicht erreicht. Nach JONES & WOODS [1986] beeinflusst Butanol schon ab etwa 5 g/L die Membranstruktur und somit den Stoffwechselprozess. Dadurch kann auch eine länger andauernde Exposition von schon geringen Butanolkonzentrationen (5 g/L) eine hemmende Wirkung auf den Prozess haben.

Die Ergebnisse zeigen das Potential der *in situ*-flüssig-flüssig-Extraktion mit Isofol®12, um die Toxizität des Endproduktes Butanol zu umgehen. Durch die *in situ*-flüssig-flüssig-Extraktion ergaben sich neue Bedingungen, welche eine erneute Optimierung des Prozesses bezüglich Medienzusammensetzung und dem Zeitpunkt der Extraktionsmittelzugabe erfordert.

3.8.3.2 Vergleich der beiden Reaktoren mit und ohne Gasumwälzung bei der Fermentation mit in situ-flüssig-flüssig-Extraktion

In Abbildung 3.8.4 sind die Ergebnisse der Reaktoransätze ohne (**A, C**), aus Kapitel 3.8.3.1, sowie mit Gasumwälzung (**B, D**) zum Vergleich dargestellt.

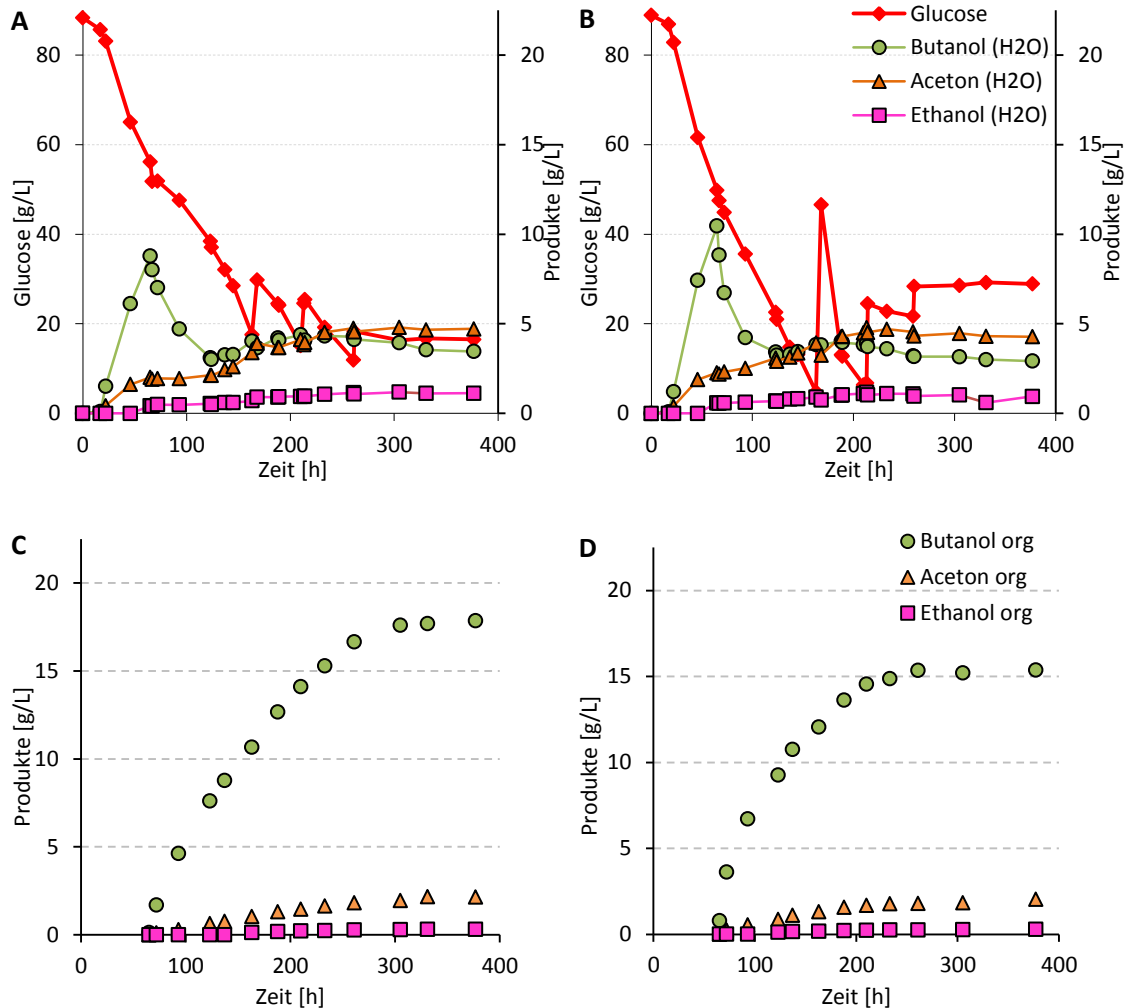


Abbildung 3.8.4: Substrat- und Endproduktkonzentrationen der 2-Phasen-Fed-Batch-Fermentation mit YA-Glucose-Medium und Isofol®12 als Extraktionsmittel, bei 26 °C, 0,2-0,3 bar, 200 RPM, Start-pH-Wert: 5,7 unregelt; Konzentrationen in der wässrigen Phase ohne (A) und mit Gasumwälzung (B); Konzentrationen der organischen Phase ohne (C) und mit Gasumwälzung (D) (siehe Abbildung 2.10.9, Seite 53)

Bereits vor Einschalten der Gasumwälzung wurden in Reaktor **B** mit 10,5 g/L innerhalb von 65 h 1,7 g/L mehr Butanol gebildet als in Vergleichsreaktor **A** (9 g/L). Dies entspricht einer Butanolproduktivität von $0,16 \text{ g(L}\cdot\text{h)}^{-1}$, wogegen in Reaktor **A** bis 65 h eine Produktivität von $0,13 \text{ g(L}\cdot\text{h)}^{-1}$ erreicht wurde. Nach Einleiten des Extraktionsmittels war in Reaktor **A**, anhand des Verlaufs der Glucosekonzentration und der OD_{535} , ein Einbruch im Substratverbrauch zu beobachten, wohingegen die Abnahme

der Glucosekonzentration in Reaktor **B** fast linear weiter verlief. 28 h später (93 h) erholte sich die Kultur in Reaktor **A** wieder.

Die Aceton- und Ethanolbildung wurde anfangs durch die Gasumwälzung in Reaktor **B**, trotz der geringen Konzentrationen von 2,3 g/L Aceton und 0,6 g/L Ethanol nach 65 h, ebenfalls begünstigt. Die Verläufe zeigten auch hier ein weniger starkes Einbrechen. Leider konnte der positive Effekt nicht über die gesamte Fermentationsdauer beobachtet werden. Die Produktivität sank im Vergleich zum Ansatz ohne Gasumwälzung nach 210 h stärker ab. Die Kultur in Reaktor **B** erreichte nach 261 h eine Butanol-Endkonzentration von 15,4 g/L in der organischen Phase und 3,2 g/L in der wässrigen Phase. Ohne Gasumwälzung (Reaktor **A**) konnten 17,8 g/L Butanol in der organischen Phase und 3,5 g/L in wässriger Phase nach 305 h gemessen werden.

Die wieder eingeleiteten Gase waren hauptsächlich CO_2 und H_2 . CO_2 hemmt die weitere Bildung von Aceton, wogegen ein höherer H_2 -Partialdruck die Umsetzung zu Butanol und Ethanol begünstigt [BROSSEAU ET AL. 1986].

4 Zusammenfassung und Ausblick

Butanol, als wichtige Basischemikalie in der Kunststoff- und Lackindustrie sowie als potentieller Kraftstoff für Verbrennungsmotoren, wird aktuell aus immer knapper werdenden fossilen Rohstoffen petrochemisch hergestellt. Ein alternativer biotechnischer Prozess ist die ABE-Fermentation, bei der die Lösungsmittel Aceton, Butanol und Ethanol mit Hilfe solventogener Clostridien gebildet werden. Das in dieser Arbeit verwendete Bakterium *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (*C. spba.*) ist einer von vier Stämmen die als Hauptprodukt Butanol bilden. Er ist in der Lage eine Vielzahl von Substraten zu verwerten, bildete kaum Ethanol und zeigte, im Gegensatz zu anderen Stämmen, nur unter bestimmten Bedingungen Sporenbildung. Der ABE-Prozess ist heute jedoch, aufgrund seiner geringen Endkonzentrationen und Ausbeuten, nicht wirtschaftlich durchführbar. Die größten Herausforderungen liegen bei der Substitution der bislang eingesetzten und mit Nahrungsmitteln konkurrierenden Substrate und in der Toxizität des Endproduktes Butanol. Bisher konnten nur Butanolkonzentrationen von 15-21 g/L in der Fermentationsbrühe erreicht werden.

Zur Senkung der Prozesskosten wurde eine Reduktion der Komplexbestandteile (Trypton und Hefeextrakt) im Medium angestrebt. Der Einsatz von Medien ohne Trypton führte jedoch zu drastischen Einbrüchen in der Lösungsmittelbildung. Zudem verstärkte sich ohne Trypton der Einfluss der Durchmischung sowie der ungehinderten Freisetzung der Gase auf die Lösungsmittelbildung. Durch eine Optimierung der Fermentationsparameter (27 °C, 0,2 bar Überdruck und 200 RPM) konnten vergleichbare Lösungsmittelkonzentrationen (bis zu 16,5 g/L Butanol) wie mit Trypton erreicht werden. In Versuchen mit definierten Medien, ohne Komplexbestandteile konnten ebenfalls Konzentrationen von 12 g/L erzielt werden. Die Produktbildung wurde jedoch durch die Zugabe von bis zu 2 g/L Hefeextrakt begünstigt. Es sollte daher untersucht werden, ob Hefeextraktkonzentrationen von über 2 g/L noch höhere Produktkonzentrationen ermöglichen. Da Hefeextrakt einen bedeutenden Kostenfaktor im Fermentationsprozess darstellt sollte auch untersucht werden, ob günstigere Ersatzstoffe wie Fischmehl, Maisquellwasser oder Sojaprotein zu vergleichbaren Ergebnissen führen.

Untersuchungen zur Verwertbarkeit von Agrarreststoffen oder -rohstoffen zeigten, dass Zuckerrübe und Weizenkaff-Hydrolysat geeignete Substrate für die Fermentation zu Butanol darstellen. In Vialversuchen wurden bereits Konzentrationen von bis zu 12 g/L gebildet. Bei Vialversuchen, in denen Agrarsubstrate eingesetzt wurden, war der positive Effekt von Hefeextrakt auf die Produktbildung nicht mehr zu erkennen. Der Einsatz von Agrarsubstraten, wie Zuckerrübe oder Weizenkaffhydrolysat, sollte in Fermentationen mit und ohne Hefeextrakt unter Reaktorbedingungen mit *C. spba.* untersucht werden.

Die Zugabe von Acetat hatte entscheidenden Einfluss auf die Produktbildung. Ohne Acetat wurden kaum Lösungsmittel gebildet. Acetatkonzentrationen von über 2,5 g/L erhöhten den Anteil an Aceton im Produktspektrum signifikant. Um den Stoffwechsel von *C. spba.* besser nachvollziehen zu können und daraus Prozessoptimierungen ableiten zu können wäre eine Untersuchung zur Zusammensetzung der Gasphase im Reaktor hilfreich.

Ferredoxin, als eisen-schwefelhaltiges Protein, ist ein bedeutendes Koenzym im Stoffwechsel solventogener Clostridien. Es ist an der Bildung der Reduktionsäquivalente ($\text{NADH} + \text{H}^+$) beteiligt, die für die Reduktion der Säuren zu Alkoholen benötigt werden. Zur weiteren Optimierung des Prozesses sollten Versuche durchgeführt werden, in denen unterschiedliche Eisenkonzentrationen im Medium getestet werden. Dabei sollten die Produktbildung sowie der H_2 -Gehalt in der Gasphase als Indikatoren herangezogen werden.

Durch die Immobilisierung der Zellen konnte die Handhabung bei Repeated-Batch-Fermentationen verbessert werden, was auch ein Auswaschen bei kontinuierlichen Fermentationen verhindern würde. In Bezug auf Produktbildung und Fermentationsgeschwindigkeit konnte jedoch im Vergleich mit freien Zellen keine signifikante Verbesserung beobachtet werden.

Eine der größten Herausforderungen des Prozesses ist die Zelltoxizität des Hauptproduktes Butanol, wodurch *in situ* nur geringe Endkonzentrationen möglich sind. Um die Toxizität des Hauptproduktes Butanol zu umgehen, wurde die flüssig-flüssig-Extraktion als *in situ*-Abtrennungungsverfahren gewählt. Mit 2-Butyloctan-1-ol (Isofol®12) wurde ein geeignetes organisches Extraktionsmittel gefunden, welches

einen hohen Verteilungskoeffizienten von 5 aufweist, nicht toxisch für *C. spba.* ist und mit 145 °C einen höheren Siedepunkt als Butanol hat. Es konnte erfolgreich während einer Fermentation eingesetzt werden, wobei eine Butanolkonzentration von 17.8 g/L in der organischen Phase erreicht wurde. Mit diesem Verfahren sollten jedoch Konzentrationen von bis zu 75 g/L Butanol in der organischen Phase möglich sein, sofern in der wässrigen Phase 15 g/L erreicht werden. Die niedrige Produktkonzentration könnte auf die relativ späte Zugabe des Extraktionsmittels zurückzuführen sein, wodurch die Zellen einer Butanolkonzentration von bis zu 10 g/L ausgesetzt waren. Diese Konzentration verursachte zwar noch keine totale Hemmung der Zellen, hatte aber, laut JONES & WOODS [1986], möglicherweise schon ab 5 g/L einen negativen Einfluss auf Membranfunktion und Stoffwechsel. Die Zugabe des Extraktionsmittels sollte in zukünftigen Fermentationen mit einsetzen der solventogenen Phase erfolgen, sodass Butanolkonzentrationen von über 5 g/L in der wässrigen Phase vermieden werden.

5 Quellenverzeichnis

- AFSCHAR, A. S., C. E. V. ROSSELL AND K. SCHALLER (1990). Bacterial Conversion of Molasses to Acetone and Butanol. *Applied Microbiology and Biotechnology* **34**(2): 168-171.
- AHLERS, R. (2003). Membranverfahren. Retrieved 27.03., 2014, from <http://www.membranverfahren.info/html/membrananlagen-membranverfahre.html>.
- ALALAYAH, W. M., M. S. KALIL, A. A. H. KADHUM, ET AL. (2008). Hydrogen production using *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). *International Journal of Hydrogen Energy* **33**(24): 7392-7396.
- ANDERS, N. (2013). Enzymatische Hydrolyse von Weizenkaff. C. Kaufmann. persönliche Mitteilung, Braunschweig.
- ATSUMI, S. AND J. C. LIAO (2008a). Directed Evolution of *Methanococcus jannaschii* Citramalate Synthase for Biosynthesis of 1-Propanol and 1-Butanol by *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* **74**(24): 7802-7808.
- ATSUMI, S. AND J. C. LIAO (2008b). Metabolic engineering for advanced biofuels production from *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* **19**(5): 414-419.
- BADR, H. R., R. TOLEDO AND M. K. HAMDY (2001). Continuous acetone-ethanol-butanol fermentation by immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum*. *Biomass & Bioenergy* **20**(2): 119-132.
- BARROS, M. R. A., A. C. OLIVEIRA AND J. M. S. CABRAL (1987). Integration of enzyme catalysis in an extractive fermentation process. Laane, C., J. Tramper and M. D. Lilly(Hrsg): 185-196.
- BASF. (2008). Technisches Merkblatt Petrochemikalien, n-Butanol. from <http://www.loesemittel.basf.com/portal/streamer?fid=242486>.
- BERNHAEUER, K. AND K. KURSCHNER (1935). Butyl- und Aceton-Gärungen. I. Über Zwischenprodukte der Butanol-Aceton-Gärung. *Biochem Zeitschr* **280**((5/6)): 379-387.
- BOOTH, I. R. AND J. G. MORRIS (1975). Proton-motive force in obligate anaerobic bacterium *Clostridium-pasteurianum* - Role in galactose and gluconate uptake. *Febs Letters* **59**(2): 153-157.
- BOWLES, L. K. AND W. L. ELLEFSON (1985). Effects of butanol on *Clostridium-acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **50**(5): 1165-1170.
- BP (2013). BP Statistical Review of World Energy. London.
- BROSSEAU, J. D., J. Y. YAN AND K. V. LO (1986). The relationship between hydrogen gas and butanol production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*. *Biotechnology and Bioengineering* **28**: 305-310.
- BRYANT, D. L. AND H. P. BLASCHEK (1988). Buffering as a means for growth and butanol production by *Clostridium-acetobutylicum*. *Journal of Industrial Microbiology* **3**(1): 49-55.
- BUTALCO-GMBH. (2013). Technology. Retrieved 27.03., 2014, from <http://www.butalco.com/Technology/technology.html>.

Quellenverzeichnis

- BUTAMAXTM. (2014). ButamaxTM Technology. Retrieved 27.03., 2014, from <http://www.butamax.com/renewable-fuel-technologies.aspx>.
- CATHAY-INDUSTRIAL-BIOTECH-LTD. (2012). Technology. Retrieved 27.03., 2014, from <http://www.cathaybiotech.com/en/about/technology>.
- CERESANA (2014). Marktstudie Butanol, Ceresana - Market Intelligence. Consulting.
- CHEN, C. K. AND H. P. BLASCHEK (1999a). Acetate enhances solvent production and prevents degeneration in *Clostridium beijerinckii* BA101. Applied Microbiology and Biotechnology **52**(2): 170-173.
- CHEN, C. K. AND H. P. BLASCHEK (1999b). Effect of acetate on molecular and physiological aspects of *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 solvent production and strain degeneration. Applied and Environmental Microbiology **65**(2): 499-505.
- CHIAO, J. S. AND Z. H. SUN (2007). History of the acetone-butanol-ethanol fermentation industry in China: Development of continuous production technology. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology **13**(1-3): 12-14.
- CHOTEBORSKA, P., B. PALMAROLA-ADRADOS, M. GALBE, ET AL. (2004). Processing of wheat bran to sugar solution. Journal of Food Engineering **61**(4): 561-565.
- COBALT-TECHNOLOGIES. (2012). Butanol's High-Value Markets. 2012, from <http://www.cobalttech.com/biobutanol.html>.
- DE BONT, J. A. M. (1998). Solvent-tolerant bacteria in biocatalysis. Trends in Biotechnology **16**(12): 493-499.
- DEL CERRO, C., C. FELPETO-SANTERO, A. ROJAS, ET AL. (2014). Genome sequence of the butanol hyperproducer *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4. ASM genome Announcements **1**(2): 1-2.
- DOREMUS, M. G., J. C. LINDEN AND A. R. MOREIRA (1985). Agitation and pressure effects on acetone-butanol fermentation. Biotechnology and Bioengineering **27**(6): 852-860.
- DURRE, P. (2008). Fermentative butanol production - Bulk chemical and biofuel. Incredible Anaerobes: from Physiology to Genomics to Fuels **1125**: 353-362.
- DÜRRE, P. (2005). Formation of Solvents in Clostridia. Handbook on Clostridia. P. Dürre (Hrsg). Boca Raton, Taylor & Francis-CRC Press.
- DURRE, P., H. BAHL AND G. GOTTSCHALK (1992). Acetone-butanol fermentation - Basis of a modern biotechnological process? Chemie Ingenieur Technik **64**(6): 491-498.
- EVANKO, W. A., A. M. EYAL, D. A. GLASSNER, ET AL. (2009). Recovery of higher alcohols from dilute aqueous solutions, Gevo, Inc.
- EVANS, P. J. AND H. Y. WANG (1988a). Enhancement of butanol formation by *Clostridium-acetobutylicum* in the presence of decanol-oleyl alcohol mixed extractants. Applied and Environmental Microbiology **54**(7): 1662-1667.
- EVANS, P. J. AND H. Y. WANG (1988b). Response of *Clostridium acetobutylicum* to the presence of mixed extractants. Applied Biochemistry and Biotechnology **17**: 175-192.
- EZEJI, T. C. AND H. P. BLASCHEK (2005). Industrial relevant fermentations. Handbook of Clostridia. P. Dürre (Hrsg). Boca Raton, CRC Press: 797-812.
- EZEJI, T. C., N. QURESHI AND H. P. BLASCHEK (2004). Acetone butanol ethanol (ABE) production from concentrated substrate: reduction in substrate inhibition by fed-batch

Quellenverzeichnis

- technique and product inhibition by gas stripping. *Applied Microbiology and Biotechnology* **63**(6): 653-658.
- EZEJI, T. C., N. QURESHI AND H. P. BLASCHEK (2007). Bioproduction of butanol from biomass: from genes to bioreactors. *Current Opinion in Biotechnology* **18**(3): 220-227.
- FOND, O., J. M. ENGASSER, G. MATTAELAMOURI, ET AL. (1986). The acetone butanol fermentation on glucose and xylose 1. Regulation and kinetics in batch cultures. *Biotechnology and Bioengineering* **28**(2): 160-166.
- FORSBERG, C. W. (1987). Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium acetobutylicum* and other *Clostridium* species. *Applied and Environmental Microbiology* **53**(4): 639-643.
- FRICK, C. AND K. SCHUGERL (1985). Continuous production of acetone butanol with free and immobilized *Clostridium acetobutylicum*. *Chemie Ingenieur Technik* **57**(12): 1112-1113.
- FRIEDL, A., N. QURESHI AND I. S. MADDOX (1991). Continuous acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation using immobilized cells of *Clostridium-acetobutylicum* in a packed-bed reactor and integration with product removal by pervaporation. *Biotechnology and Bioengineering* **38**(5): 518-527.
- GABRIEL, C. L. (1928). Butanol fermentation process. *Industrial & Engineering Chemistry* **20**: 1063-1067.
- GABRIEL, C. L. AND F. M. CRAWFORD (1930). Development of the butyl-acetonic fermentation industry. *Indust & Eng Chem* **22**((11)): 1163-1165.
- GARCIA, V. N., J. P., KKILA, H. OJAMO, ET AL. (2011). Challenges in biobutanol production: How to improve the efficiency? *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **15**: 964-980.
- GEVO. (2014). Our business. Retrieved 27.03., 2014, from <http://www.gevo.com/about/our-business/isobutanol/>.
- GIBBS, D. F. (1983). The rise and fall (... and rise?) of acetone/butanol fermentations. *Trends in Biotechnology* **1**: 12-15.
- GREEN-BIOLOGICS. (2014). Technology. Retrieved 27.03., 2014, from <http://www.greenbiologics.com/technology.php>.
- GREEN, E. M. (2011). Fermentative production of butanol - the industrial perspective. *Current Opinion in Biotechnology* **22**(3): 337-343.
- GRUPE, H. AND G. GOTTSCHALK (1992). Physiological events in *Clostridium-acetobutylicum* during the shift from acidogenesis to solventogenesis in continuous culture and presentation of a model for shift induction. *Applied and Environmental Microbiology* **58**(12): 3896-3902.
- HAGGSTROM, L. (1985). Acetone-butanol fermentation and its variants. *Biotechnology Advances* **3**(1): 13-28.
- HARTMANIS, M. G. N., T. KLASON AND S. GATENBECK (1984). Uptake and activation of acetate and butyrate in *Clostridium-acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **20**(1): 66-71.
- HEAP, J. T., S. A. KUEHNE, M. EHSAAN, ET AL. (2010). The ClosTron: Mutagenesis in *Clostridium* refined and streamlined. *Journal of Microbiological Methods* **80**(1): 49-55.

Quellenverzeichnis

- HELLERT, J. (2013). Untersuchung der Verteilungskoeffizienten möglicher Extraktionsmittel für Butanol in einer wässrigen Modelllösung. C. Kaufmann. persönliche Mitteilung, Braunschweig.
- HERBSTREITH-FOX. (2014). Pektine. Retrieved 04.04., 2014, from <http://www.herbstreith-fox.de/de/pektine.html>.
- HERRERO, A. A. (1983). End-product inhibition in anaerobic fermentations. Trends in Biotechnology **1**(2): 49-53.
- HUANG, W. C., D. E. RAMEY AND S. T. YANG (2004). Continuous production of butanol by *Clostridium acetobutylicum* immobilized in a fibrous bed bioreactor. Applied Biochemistry and Biotechnology **113**: 887-898.
- HUTKINS, R. W. AND E. R. KASHKET (1986). Phosphotransferase activity in *Clostridium-acetobutylicum* from acidogenic and solventogenic phases of growth. Applied and Environmental Microbiology **51**(5): 1121-1123.
- JAEGER, D. (2013). Untersuchung wasslöslicher Verunreinigungen in Isofol 12. C. Kaufmann. Braunschweig.
- JAHNZ, U. (2000). Neuartiges Gerät zur Herstellung linsenförmiger Hydrogele im Labormaßstab (LentiKat®Printer). Schriftreihe "Nachwachsende Rohstoffe". Münster, Landwirtschaftsverlag. **15**: 162-166.
- JEKEL, M., A. BUHR, U. JAHNZ, ET AL. (1998). Immobilization of Starter Cultures in Polyvinylalcohol for Agricultural Use. Sustainable Agriculture for Food, Energy and Industry : Strategies towards Achievement ; Proceedings of the International Conference held in Braunschweig, Germany, June 1997 ; Vol. 1. N. El Bassam, R. K. Behl and B. Prochnow (Hrsg). London , UK, James & James: 192-194.
- JONES, D. T. AND D. R. WOODS (1986). Aceton-Butanol Fermentation Revisited. Microbiological Reviews **50**(4): 484-524.
- KANNO, M., T. KATAYAMA, H. TAMAKI, ET AL. (2013). Isolation of Butanol- and Isobutanol-Tolerant Bacteria and Physiological Characterization of Their Butanol Tolerance. Applied and Environmental Microbiology **79**(22): 6998-7005.
- KASHKET, E. R. AND Z. Y. CAO (1993). Isolation of A Degeneration-Resistant Mutant of *Clostridium-Acetobutylicum* Ncimb-8052. Applied and Environmental Microbiology **59**(12): 4198-4202.
- KEIS, S., R. SHAHEEN AND D. T. JONES (2001). Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and descriptions of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* sp nov and *Clostridium saccharobutylicum* sp nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology **51**: 2095-2103.
- KILLEFFER (1927). Butanol and acetone from corn. Industrial & Engineering Chemistry **19**(1): 46-50.
- KIM, B. H., P. BELLOWES, R. DATTA, ET AL. (1984). Control of carbon and electron flow in *Clostridium-acetobutylicum* fermentations - Utilization of carbon-monoxide to inhibit hydrogen-production and to enhance butanol yields. Applied and Environmental Microbiology **48**(4): 764-770.
- KIM, J., R. BAJPAI AND E. L. IANNOTTI (1988). Redox potential in acetone butanol fermentations. Applied Biochemistry and Biotechnology **18**: 175-186.
- KIM, J. K., E. IANNOTTI AND R. BAJPAI (1999). Extraktive Recovery of Products from Fermentation Broths. Biotechnol. Bioprocess Eng. **4**(1): 1-11.

Quellenverzeichnis

- KLEIN-MARCUSCHAMER, D., C. N. S. SANTOS, H. M. YU, ET AL. (2009). Mutagenesis of the Bacterial RNA Polymerase Alpha Subunit for Improvement of Complex Phenotypes. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(9): 2705-2711.
- KNOSHAUG, E. P. AND M. ZHANG (2009). Butanol Tolerance in a Selection of Microorganisms. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **153**(1-2): 13-20.
- KUMAKURA, M. AND I. KAETSU (1984). Enzymatic-Hydrolysis of chaff using immobilized growing-cells. *Agricultural Wastes* **11**(4): 259-268.
- KUMAR, M. AND K. GAYEN (2011). Developments in biobutanol production: New insights. *Applied Energy* **88**(6): 1999-2012.
- LANGER, T. (2008). Membranen. *Biochemie - Zellbiologie*. K. Munk (Hrsg). Stuttgart, Georg Thieme Verlag KG: 348-366.
- LARGIER, S. T., S. LONG, J. D. SANTANGELO, ET AL. (1985). Immobilized *Clostridium-acetobutylicum* P262 mutants for solvent production. *Applied and Environmental Microbiology* **50**(2): 477-481.
- LEE, S. Y., J. H. PARK, S. H. JANG, ET AL. (2008). Fermentative butanol production by clostridia. *Biotechnology and Bioengineering* **101**(2): 209-228.
- LIN, L., Z. CUNSHAN, S. VITTAYAPADUNG, ET AL. (2011). Opportunities and challenges for biodiesel fuel. *Applied Energy* **88**(4): 1020-1031.
- LIU, S. Q. AND N. QURESHI (2009). How microbes tolerate ethanol and butanol. *New Biotechnology* **26**(3-4): 117-121.
- MADDIPATI, P., H. K. ATIYEH, D. D. BELLMER, ET AL. (2011). Ethanol production from syngas by *Clostridium* strain P11 using corn steep liquor as a nutrient replacement to yeast extract. *Bioresource Technology* **102**(11): 6494-6501.
- MADDOX, I. S. (1989). The acetone-butanol-ethanol fermentation - recent progress in technology. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* **7**: 189-220.
- MADIGAN, M. T., J. M. MARTINKO AND J. PARKER (2003a). Gärungsreaktionen. *Brock-Mikrobiologie*. W. Goebel (Hrsg). Berlin, Spektrum akademischer Verlag Heidelberg: 690-692.
- MADIGAN, M. T., J. M. MARTINKO AND J. PARKER (2003b). Industrielle Mikrobiologie/Biokatalyse. *Brock Mikrobiologie*. W. Goebel (Hrsg). Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag: 427-469.
- MADIGAN, M. T., J. M. MARTINKO AND J. PARKER (2003c). Mikrobielle Evolution und Systematik. *Brock Mikrobiologie*. W. Goebel (Hrsg). Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag: 471-504.
- MADIHAH, M. S., A. B. ARIFF, K. M. SAHAID, ET AL. (2001). Direct fermentation of gelatinized sago starch to acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **17**(6): 567-576.
- MATSUMURA, M. AND H. MÄRKL (1986). Elimination of ethanol inhibition by perstraction. *Biotechnology and Bioengineering* **28**(4): 534-541.
- MATTA-EL-AMOURI, G., R. JANATI-IDRISSI, O. ASSOBEI, ET AL. (1985). Mechanism of the acetone formation by *Clostridium-acetobutylicum*. *Fems Microbiology Letters* **30**(1-2): 11-16.
- MEIER, B. (2001, 2012). Meiers Wein-Seite. Retrieved 13.12., 2013, from <http://www.wzw.tum.de/~bmeier/>.

Quellenverzeichnis

- METABOLICEXPLORER (2012). Annual Report. Providing a sustainable green solution to industrial players who want to produce differently: 130.
- MILLAT, T., H. JANSSEN, G. J. THORN, ET AL. (2013). A shift in the dominant phenotype governs the pH-induced metabolic switch of *Clostridium acetobutylicum* in phosphate-limited continuous cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**(14): 6451-6466.
- MOLLAH, A. H. AND D. C. STUCKEY (1992). The influence of H₂, CO₂ and dilution rate on the continuous fermentation of acetone-butanol. *Applied Microbiology and Biotechnology* **37**(5): 533-538.
- MONOT, F., J. M. ENGASSER AND H. PETITDEMANGE (1984). Influence of pH and Undissociated Butyric-Acid on the Production of Acetone and Butanol in Batch Cultures of *Clostridium-Acetobutylicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **19**(6): 422-426.
- MOREIRA, A. R., D. C. ULMER AND J. C. LINDEN (1981). Butanol toxicity in the butylic fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* **11**: 567-579.
- MUTSCHLECHNER, O., H. SWOBODA AND J. R. GAPES (2000). Continuous two-stage ABE-fermentation using *Clostridium beijerinckii* NRRL B592 operating with a growth rate in the first stage vessel close to its maximal value. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **2**(1): 101-105.
- NAKAYAMA, S. I., T. KOSAKA, H. HIRAKAWA, ET AL. (2008). Metabolic engineering for solvent productivity by downregulation of the hydrogenase gene cluster hupCBA in *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* strain N1-4. *Applied Microbiology and Biotechnology* **78**(3): 483-493.
- NEUMANN, A. (1993). Untersuchung zur anaeroben Dechlorierung von Tetrachlorethen in *Dehalospirillum multivorans* spec. nov. Diplomarbeit, Universität Stuttgart.
- NI, Y. AND Z. H. SUN (2009). Recent progress on industrial fermentative production of acetone-butanol-ethanol by *Clostridium acetobutylicum* in China. *Applied Microbiology and Biotechnology* **83**(3): 415-423.
- NICOLAOU, S. A., S. M. GAIDA AND E. T. PAPOUTSAKIS (2010). A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: From biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation. *Metabolic Engineering* **12**(4): 307-331.
- NIELSEN, D. R., E. LEONARD, S. H. YOON, ET AL. (2009). Engineering alternative butanol production platforms in heterologous bacteria. *Metabolic Engineering* **11**(4-5): 262-273.
- NOLLING, J., G. BRETON, M. V. OMELCHENKO, ET AL. (2001). Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of Bacteriology* **183**(16): 4823-4838.
- OUNINE, K., H. PETITDEMANGE, G. RAVAL, ET AL. (1985). Regulation and butanol inhibition of D-Xylose and D-Glucose uptake in *Clostridium-acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **49**(4): 874-878.
- PALMAROLA-ADRADOS, B., P. CHOTEBORSKA, M. GALBE, ET AL. (2005). Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. *Bioresource Technology* **96**(7): 843-850.

Quellenverzeichnis

- PAREDES, C. J., K. V. ALSAKER AND E. T. PAPOUTSAKIS (2005). A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nature Reviews Microbiology* **3**(12): 969-978.
- PARK, C. H., M. R. OKOS AND P. C. WANKAT (1989). Acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation in an immobilized cell trickle bed reactor. *Biotechnology and Bioengineering* **34**(1): 18-29.
- PASTEUR, L. (1862). Quelques résultats nouveaux relatives aux fermentations acétique et butyrique. *Bull Soc Chim Paris*: 52-53.
- QURESHI, N. AND H. P. BLASCHEK (2001). Recent advances in ABE fermentation: hyperbutanol producing *Clostridium beijerinckii* BA101. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **27**(5): 287-291.
- QURESHI, N. AND I. S. MADDOX (1991). Integration of Continuous Production and Recovery of Solvents from Whey Permeate - Use of Immobilized Cells of *Clostridium-Acetobutylicum* in A Fluidized-Bed Reactor Coupled with Gas Stripping. *Bioprocess Engineering* **6**(1-2): 63-69.
- QURESHI, N., I. S. MADDOX AND A. FRIEDL (1992). Application of continuous substrate feeding to the ABE fermentation - relief of product inhibition using extraction, perstraction, stripping, and pervaporation. *Biotechnology Progress* **8**(5): 382-390.
- QURESHI, N., A. H. J. PATERSON AND I. S. MADDOX (1988). Model for continuous production of solvents from whey permeate in a packed-bed reactor using cells of *Clostridium-acetobutylicum* immobilized by adsorption onto bonechar. *Applied Microbiology and Biotechnology* **29**(4): 323-328.
- RAMEY, D. AND S.-T. YANG (2004). Production of butyric acid and butanol from biomass. Final Report. Morgantown, WV, U.S. Department of Energy.
- REILLY, J., W. J. HICKINBOTTOM, F. R. HENLY, ET AL. (1920). The products of the "acetone: n-butyl alcohol" fermentation of carbohydrate material with special reference to some of the intermediate substances produced. *Biochemical Journal* **14**: 229-251.
- RICHTER, H., N. QURESHI, S. HEGER, ET AL. (2012). Prolonged conversion of n-butyrate to n-butanol with *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* in a two-stage continuous culture with in-situ product removal. *Biotechnology and Bioengineering* **109**(4): 913-921.
- RIEBELING, V., R. K. THAUER AND K. JUNGERMANN (1975). Internal-alkaline pH gradient, sensitive to uncoupler and ATPase inhibitor, in growing *Clostridium-pasteurianum*. *European Journal of Biochemistry* **55**(2): 445-453.
- RIES, L. W., E. KLAPP AND F. HARING (1957). Kaff-Definition. Pareys Landwirtschafts-Lexikon. L. W. Ries (Hrsg). Hamburg & Berlin, Verlag Paul Parey. **7**: 240.
- RIVAS, B., A. TOIZRADO, P. TORRE, ET AL. (2008). Submerged citric acid fermentation on orange peel autohydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(7): 2380-2387.
- ROFFLER, S. R., H. W. BLANCH AND C. R. WILKE (1988). Insitu extractive fermentation of acetone and butanol. *Biotechnology and Bioengineering* **31**(2): 135-143.
- ROSE, A. H. (1961). *Industrial microbiology*, London, Butterworths.
- ROTH, C. (2013). Sicherheitsdatenblatt gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006. Retrieved 08.04., 2014, from <http://www.carl-roth.de/jsp/de-de/sdpdf/9065.PDF>.

Quellenverzeichnis

- RUHL, J., A. SCHMID AND L. M. BLANK (2009). Selected *Pseudomonas putida* Strains Able To Grow in the Presence of High Butanol Concentrations. *Applied and Environmental Microbiology* **75**(13): 4653-4656.
- SASOL (2011). Sasol Olefins & Surfactants ISOVOL® C12-C32 Defined Branched Guerbet Alcohols, Sasol Germany GmbH: 1-11.
- SCHOUTENS, G. H., M. C. H. NIEUWENHUIZEN AND N. W. F. KOSSEN (1985). Continuous butanol production from whey permeate with immobilized *Clostridium beijerinckii* LMD-27.6. *Applied Microbiology and Biotechnology* **21**(5): 282-286.
- SETTANNI, L., E. PALAZZOLO, V. GUARRASI, ET AL. (2012). Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily. *Food Control* **26**(2): 326-330.
- SHINTO, H., Y. TASHIRO, G. KOBAYASHI, ET AL. (2008). Kinetic study of substrate dependency for higher butanol production in acetone-butanol-ethanol fermentation. *Process Biochemistry* **43**(12): 1452-1461.
- SOUCAILLE, P., G. JOLIFF, A. IZARD, ET AL. (1987). BUTANOL TOLERANCE AND AUTOBACTERIOCIN PRODUCTION BY CLOSTRIDIUM-ACETOBUTYLICUM. *Current Microbiology* **14**(5): 295-299.
- SPIVEY, M. J. (1978). Acetone-Butanol-Ethanol Fermentation. *Process Biochemistry* **13**(11): 2-5.
- SPRING, S. (2012). Keine Sporulation von *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (DSMZ14923) in 104b-Medium; persönliche Mitteilung. C. Kaufmann. Braunschweig, DSMZ.
- STEEN, E. J., R. CHAN, N. PRASAD, ET AL. (2008). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of n-butanol. *Microbial Cell Factories* **7**.
- STRAND, G. AND K. D. HIESCHE. (2004). Über Temperatur. Retrieved 13.12., 2013, from <http://www.brennhefe.com/temperatur.htm>.
- STREIT, B., F. MARTI, N. BERGER, ET AL. (2011, 2011). Spreu ist mehr wert. SHL Info HESA, 2011, from http://www.hafl.bfh.ch/fileadmin/docs/Home/ueberShl/Magazin_Taetigkeitsbericht/SHL-Magazin_Nr10-2011.pdf.
- SYNTECBIOFUEL. (2008). Technology, The art of forward thinking. Retrieved 27.03., 2014, from <http://www.syntecbiofuel.com/process.php>.
- TANAKA, S., Y. TASHIRO, G. KOBAYASHI, ET AL. (2012). Membrane-assisted extractive butanol fermentation by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 with 1-dodecanol as the extractant. *Bioresource Technology* **116**: 448-452.
- TASHIRO, Y. AND K. SONOMOTO (2010). Advances in butanol production by Clostridia. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. A. M. Vilas (Hrsg). Badajoz, Formatex Research Center: 1383-1394.
- TASHIRO, Y., K. TAKEDA, G. KOBAYASHI, ET AL. (2005). High production of acetone-butanol-ethanol with high cell density culture by cell-recycling and bleeding. *Journal of Biotechnology* **120**(2): 197-206.
- TASHIRO, Y., K. TAKEDA, G. KOBAYASHI, ET AL. (2004). High Butanol Production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 in Fed-Batch Culture with pH-Stat Continuous Butyric Acid and Glucose Feeding Method. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **98**(4): 263-268.

Quellenverzeichnis

- TASHIRO, Y., T. YOSHIDA, T. NOGUCHI, ET AL. (2013). Recent advances and future prospects for increased butanol production by acetone-butanol-ethanol fermentation. *Engineering in Life Sciences* **13**(5): 432-445.
- TWIGG, R. S. (1945). Oxidation-reduction aspects of resazurin. *Nature* **155**(3935): 401-402.
- VAN DER WESTHUIZEN, A., D. T. JONES AND D. R. WOODS (1982). Autolytic activity and butanol tolerance of *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* **44**(6): 1277-1281.
- VANE, L. M. (2005). A review of pervaporation for product recovery from biomass fermentation processes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **80**(6): 603-629.
- VANE, L. M. (2008). Separation technologies for the recovery and dehydration of alcohols from fermentation broths. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr* **2**(6): 553-588.
- VIRUNANON, C., S. CHANTAROOPAMAI, J. DENDUANGBORIPANT, ET AL. (2008). Solventogenic-cellulolytic clostridia from 4-step-screening process in agricultural waste and cow intestinal tract (vol 14, pg 109, 2008). *Anaerobe* **14**(4): 250-250.
- VOLLHERBST-SCHNECK, K., J. A. SANDS AND B. S. MONTENECOURT (1984). Effect of butanol on lipid-composition and fluidity of *Clostridium-acetobutylicum* ATCC-824. *Applied and Environmental Microbiology* **47**(1): 193-194.
- VORLOP, K. D. AND M. JEKEL (2000). Verfahren zur Herstellung eines Gels aus Polyvinylalkohol und nach dem Verfahren hergestelltes mechanisch hoch stabiles Gel. K. D. Vorlop. DE.
- WALTON, M. T. AND J. L. MARTIN (1979). Production of butanol-acetone by fermentation. New York, USA;
- London, England, Academic Press, INC.
- WANG, Y., X. Z. LI, C. B. MILNE, ET AL. (2013). Development of a Gene Knockout System Using Mobile Group II Introns (Targetron) and Genetic Disruption of Acid Production Pathways in *Clostridium beijerinckii*. *Applied and Environmental Microbiology* **79**(19): 5853-5863.
- WEIZMANN, C. (1919). Production of acetone and alcohol by bacteriological processes. United States Patent Office. England. **1,315,585**: 2.
- WELSH, F. W., R. E. WILLIAMS AND I. A. VELIKY (1987). Solid carriers for a *Clostridium-acetobutylicum* that produces acetone and butanol. *Enzyme and Microbial Technology* **9**(8): 500-502.
- WILKENS, E., A. K. RINGEL, D. HORTIG, ET AL. (2012). High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a. *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**(3): 1057-1063.
- WOOD, H. G., R. W. BROWN AND C. H. WERKMAN (1945). Mechanism of the Butyl Alcohol Fermentation with Heavy Carbon Acetic and Butyric Acids and Acetone. *Archives of Biochemistry* **6**(2): 243-260.
- WU, Y.-R., Y. LI, K.-L. YANG, ET AL. (2012). Draft Genome Sequence of Butanol-Acetone-Producing *Clostridium beijerinckii* Strain G117. *Journal of Bacteriology* **194**(19): 5470-5471.
- YAZDANI, S. S. AND R. GONZALEZ (2007). Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. *Current Opinion in Biotechnology* **18**(3): 213-219.

Quellenverzeichnis

- YEN, H. W., R. J. LI AND T. W. MA (2011). The development process for a continuous acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation by immobilized *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* **42**(6): 902-907.
- YERUSHALMI, L., B. VOLESKY, W. K. LEUNG, ET AL. (1983). Variations of solvent yield in acetone-butanol fermentation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **18**(5): 279-286.
- YU, M. R., Y. L. ZHANG, I. C. TANG, ET AL. (2011). Metabolic engineering of *Clostridium tyrobutyricum* for n-butanol production. *Metabolic Engineering* **13**(4): 373-382.
- ZVERLOV, V. V., O. BEREZINA, G. A. VELIKODVORSKAYA, ET AL. (2006). Bacterial acetone and butanol production by industrial fermentation in the Soviet Union: use of hydrolyzed agricultural waste for biorefinery. *Applied Microbiology and Biotechnology* **71**(5): 587-597.

6 Anhang

6.1 Abbildung zum Temperaturversuch im Reaktor

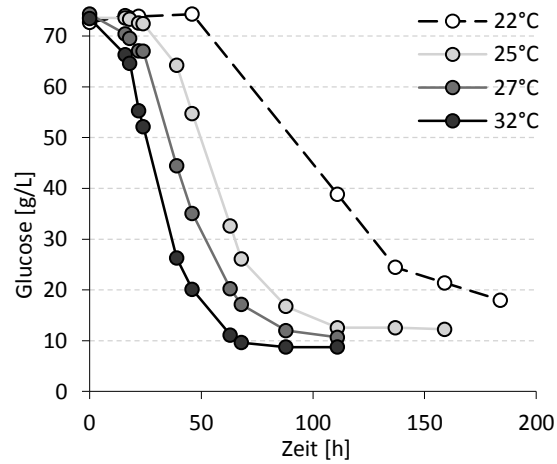


Abbildung 6.1.1: Verläufe der Glucosekonzentrationen in 200-mL-Reaktoren des Temperaturversuches mit YA-Medium

6.2 Abbildung zum Gasphasen-Versuch

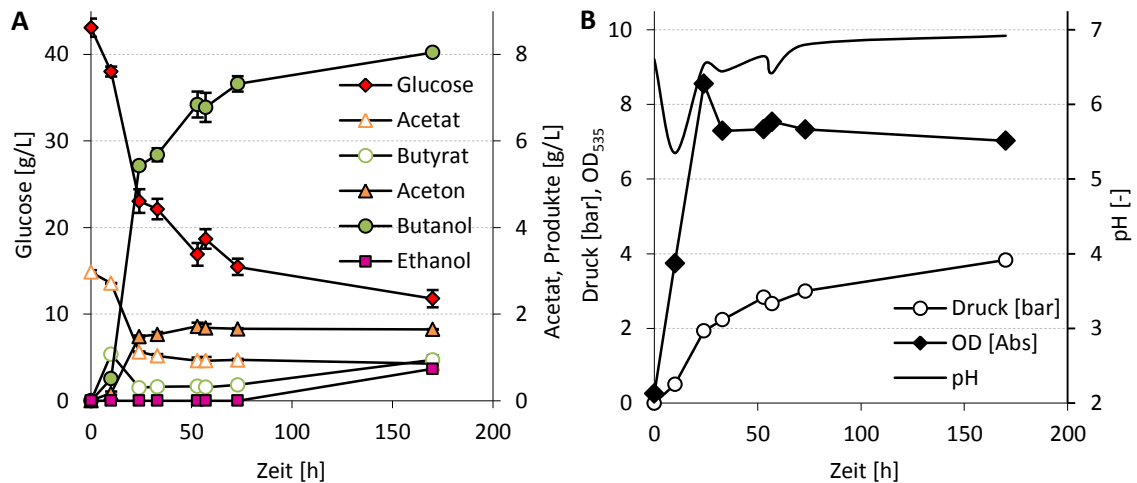


Abbildung 6.2.1: Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen (A) sowie des pH, der OD₅₃₅ und des Überdrucks (B) im 100-mL-Vial mit TYA-Medium und 40 g/L Glucose (B) im 100-mL-Vial mit TYA-Medium und 40 g/L Glucose, 3-fach-Ansatz

6.3 Bestandteile der synthetischen Modelllösung

Tabelle 6.3.1: Bestandteile der Modelllösung, pH-Wert: 6 [HELLERT 2013]

| Bestandteil | Konzentration [g/L] |
|----------------|---------------------|
| Natrium-Lactat | 1 |
| Acetat | 2 |
| Butyrat | 1 |
| Aceton | 5 |
| Butanol | 15 |
| Ethanol | 1 |
| Glucose | 60 |

6.4 Abbildung zur Langzeitfermentation im repeated-Batch

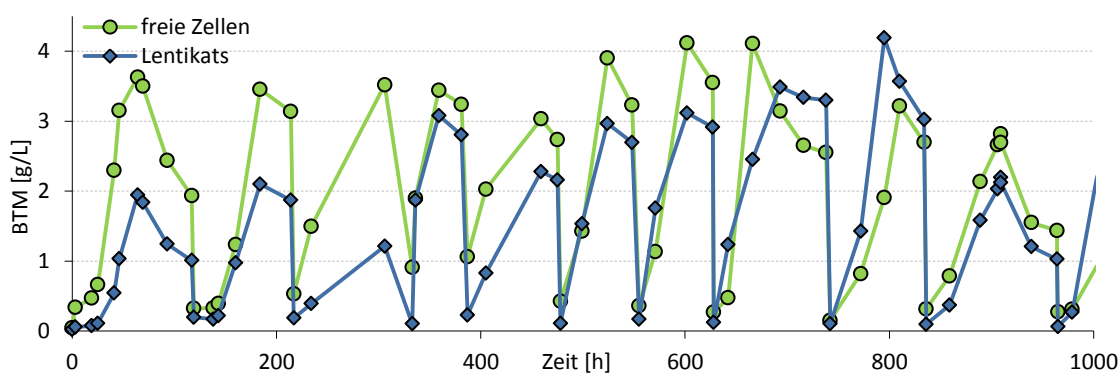


Abbildung 6.4.1: Verlauf der BTM im Medium der repeated-Batch-Fermentationen mit freien und immobilisierten Zellen (LentiKats®)

Anhang

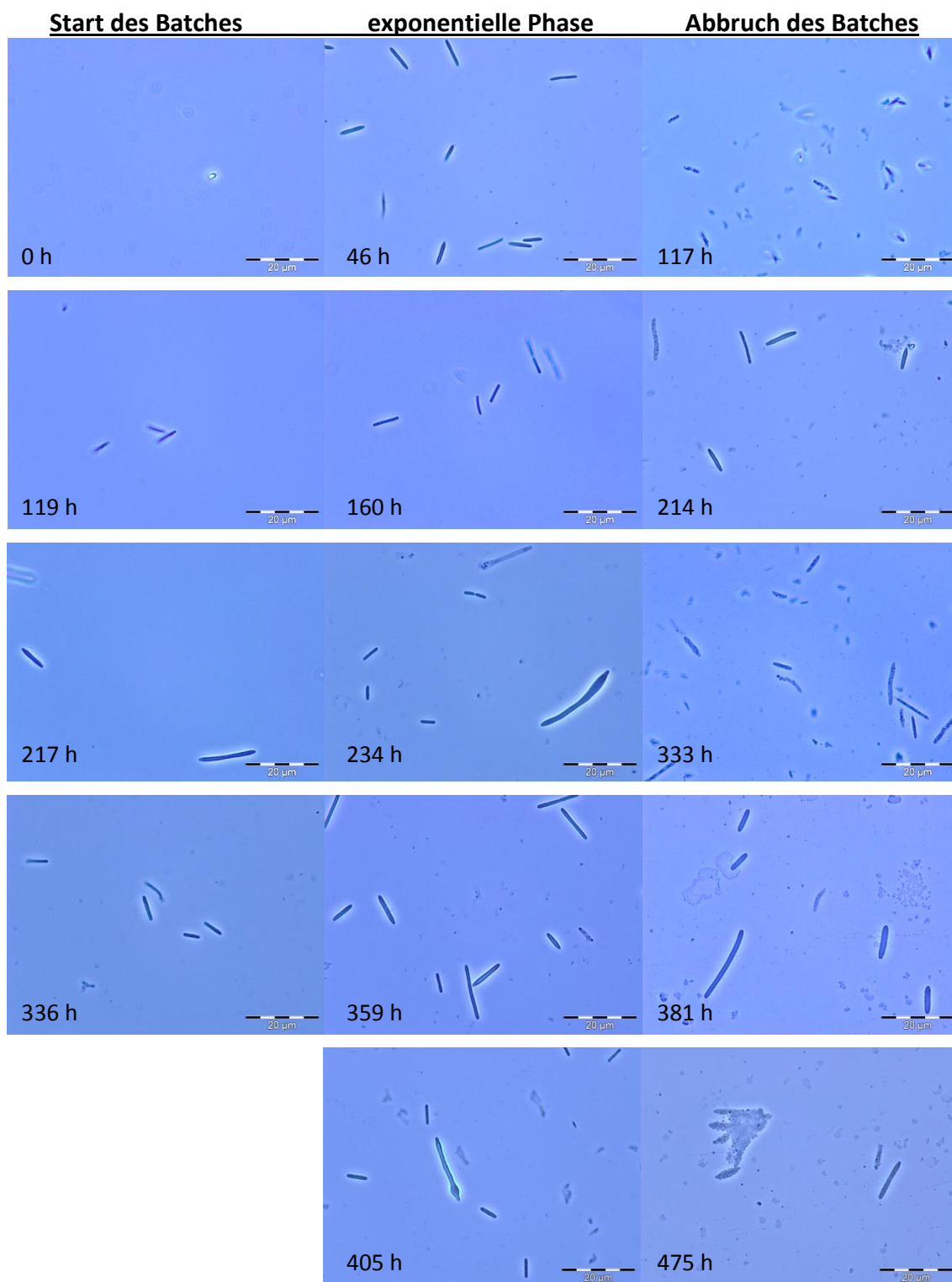


Abbildung 6.4.2: Morphologie von *C. spba.* in repeated-Batch-Fermentationen mit freien Zellen, zum Start des Batches, in exponentieller Phase und bei Abbruch des Batches, YA-Medium mit Glucose, bei 27 °C, 300 RPM und 0,2-0,3 bar; vergrößerte Ansicht ist eingerahmt (Messbalken=4 µm); Phasenkontrastaufnahme: Zeiss Axioplan, 100-fach Objektiv, Ph3, (Messbalken=20 µm), Inkubationszeit in Stunden

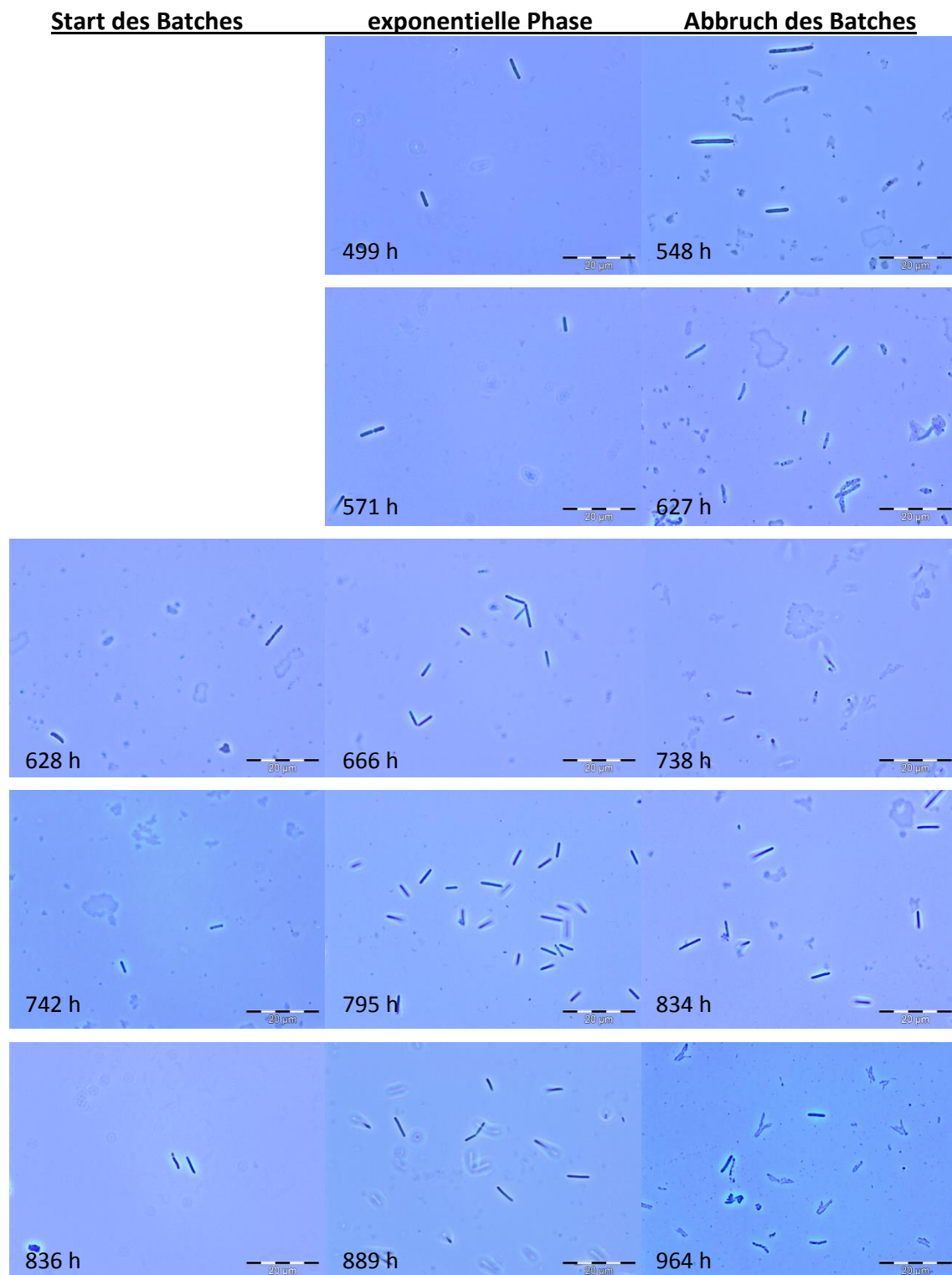


Abbildung 6.4.3: Fortsetzung Abbildung 8.4.2

6.5 Verwendete Geräte

| Gerät | Typenbezeichnung | Hersteller, Ort |
|--|---|---|
| Anaerobier-Bank | ShellabBactron IV 2 | Sheldon manufacturing INC., Cornelius, US |
| Analysenwaage | Analytic A200S | Sartorius, Göttingen, DE |
| Autoklav 18 L | CV EL 18 L | Certoclav, Traun, AT |
| Autoklav 23 L | 2540 ELC | Tuttnauer, Breda, NL |
| Autoklav 23 L | DX-23 | Systec, Wetztenberg, DE |
| Autoklav 40 L | VX-40 | Systec, Wetztenberg, DE |
| Autoklav 170 L | Fedegari FVS/2 | Tecnomara AG, Zürich, CH |
| GC-System (Gas-Analytik) | GC 14A Säulen: 2 x Porapak QS (80/100 mesh), Stahl (3m x 3 mm) Molsieb 5Å (60/80 mesh) Stahl (4,5 m x 3 mm) | Shimadzu, JP |
| GC-System (Lösungsmittel- Analytik in Isofol®12) | GC 14B Säule: ZB-WAXplus (30m x0,53mm; Fd: 1µm) | Shimadzu, JP |
| HPLC-System | Säule: Aminex HPX-87H (300x7,8mm) Vorsäule: Micro-Gaurd® Cation H+ Cartridges (30x4,6mm) Detektoren: RI und UV(210/265 mn) | BioRad, DE / Knauer, DE / Shimadzu, JP |
| Kryostaten | F25 MGW LAUDA K4R | Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, DE Messgeräte-Werk Lauda, Dr. R. Wobser KG, Lauda-Königshofen |

Anhang

| Gerät | Typenbezeichnung | Hersteller, Ort |
|-----------------------------------|-------------------------|--|
| Magnetrührer | IKAMAG REO bzw. RCT | IKA Labortechnik, Staufen, DE |
| Magnetrührer 15-fach | Variomag® Poly 15 | H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim, DE |
| Messermühle | Grindomix GM200 | Retsch GmbH, Haan, DE |
| Mikroskop mit Digitalkamera | Axioplan XC 10 | Carl Zeiss, Oberkochen, DE; Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Münster, DE |
| pH-Messkette | InLabMicro | Mettler Toledo, Gießen, DE |
| pH-Meter | 340i | WTW GmbH, Weilheim, DE |
| Photometer | T80 UV/VIS Spektrometer | PG Instruments Ltd., Wibtoft, GB |
| Plattenreader | Fluostar Omega | BMG Labtech, Ortenberg, DE |
| Schüttelinkubator | RFI 125 | Infors HT, Bottmingen, CH |
| Schüttelinkubator | Multitron (50mm) | Infors HT, Bottmingen, CH |
| Stereomikroskop mit Digitalkamera | Stemi SV8 SC30 | Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Münster, DE |
| Sterilwerkbank | Herasafe HS 18/2 | Heraeus Instruments, Hanau, DE |
| Tinkturenpresse | HP 2H | FISCHER Maschinenfabrik GmbH, Neuss, DE |
| Trockenschrank | UM 400 | Memmert GmbH & Co KG, Schwabach, DE |
| Vortex | Vortex Genie 2 | Bender & Hobein AG, Zürich, CH |
| Wasserbad | 1002 | GFL, Burgwedel, DE |
| Wasserbad | 1005 | GFL, Burgwedel, DE |
| Zentrifuge | Centrifuge 5417 | Eppendorf, Engelsdorf, DE |
| Zentrifuge | Biofuge Stratos | Heraeus Instruments, Osterode, DE |

6.6 Chemikalien

| Chemikalien | Summenformel | Reinheit | Hersteller/Vertrieb |
|---|-------------------------------|-----------------|---------------------|
| Acetaldehyd | C_2H_4O | 99,5 % | Sigma Aldrich |
| Acetat (Essigsäure) | C_1H_3COOH | zur Analyse | Merck |
| Aceton | C_3H_6O | 99,8 % | VWR International |
| 4-Aminobenzoat | C_6H_5NCOOH | zur Synthese | Fluka |
| Ammoniumacetat | $C_2H_3O_2NH_4$ | reinst | Roth |
| Ammoniumchlorid | NH_4Cl | zur Analyse | Merck |
| Ammoniumsulfat | $(NH_4)_2SO_4$ | 99,5 % | Applichem |
| Anaerocult | unbekannt | unbekannt | Merck |
| Arabinose, D(-) | $C_5H_{10}O_5$ | 99 % | Fluka |
| Arabinose, L(+) | $C_5H_{10}O_5$ | zur Analyse | Sigma |
| Argon | Ar | 5.0 | Linde/AirLiquide |
| Barrycidal 36 | unbekannt | unbekannt | VWR International |
| Biotin (Vitamin H oder B ₇) | $C_{10}H_{16}N_2O_3S$ | unbekannt | Sigma |
| Butanol, n- | $C_4H_{10}O$ | 99,5 % | Roth |
| Butyrat (n-Buttersäure) | C_3H_7COOH | zur Analyse | Fluka |
| Carbol-Fuchsin | $C_{21}H_{21}N_3 \cdot HCl$ | für Mikroskopie | Fluka |
| Cobaltchlorid Hexahydrat | $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | reinst | Fluka |
| Cyanocobalamin (Vitamin B ₁₂) | $C_{62}H_{88}CoN_{13}O_{14}P$ | reinst | Merck |
| Decanol | $C_{10}H_{22}O$ | 99 % | Fluka |
| Dodecanol | $C_{12}H_{26}O$ | 98 % | Alfa Aesar |
| Eisensulfat Heptahydrat | $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | zur Analyse | Merck |
| Ethanol | C_2H_6O | 99,8 % | Roth |
| Formiergas | N_2/H_2 | 5.0 (95/5 %) | Linde / AirLiquide |
| Fructose, D(-) | $C_6H_{12}O_6$ | für Biochemie | Merck |

Anhang

| Chemikalien | Summenformel | Reinheit | Hersteller/Vertrieb |
|--|----------------------------|-------------------|---------------------|
| Galactose, D(+) | $C_6H_{12}O_6$ | für Biochemie | Fluka |
| Galacturonsäure, D(+) | $C_6H_{10}O_7$ | für Biochemie | Merck |
| Glucose, alpha-D-, Monohydrat | $C_6H_{12}O_6$ | für Mikrobiologie | Roth |
| Glycerin | $C_3H_8O_3$ | 98 % | Roth |
| Hefeextrakt | unbekannt | reinst | VWR International |
| Helium | He | 5.0 | Linde/AirLiquide |
| Heptan | C_7H_{16} | zur Analyse | Roth |
| Isofol®12 | $C_{12}H_{26}O$ | 97 % | Sasol |
| Isofol®14 T | Gemisch | 95 % | Sasol |
| Isofol®16 | $C_{16}H_{34}O$ | 97 % | Sasol |
| Isofol®20 | $C_{20}H_{42}O$ | 97 % | Sasol |
| Kaliumdihydrogenphosphat | KH_2PO_4 | zur Analyse | Merck |
| Kohlendioxid | CO_2 | 5.0 | Linde/AirLiquide |
| Kupferchlorid Dihydrat | $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ | zur Analyse | Merck |
| Lactose, D(+) | $C_{12}H_{22}O_{11}$ | 99 % | Fluka |
| L-Cysteiniumchlorid · H ₂ O | $C_3H_8ClNO_2S \cdot H_2O$ | für Biochemie | Merck |
| Lentikat®Liquid | unbekannt | unbekannt | geniaLab® |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat | $MgSO_4$ | 99,5 % | Fluka |
| Manganchlorid Tetrahydrat | $MnCl_2$ | zur Analyse | VWR International |
| Mannose, D(+) | $C_6H_{12}O_6$ | 99 % | Fluka |
| Natriumacetat Trihydrat | $C_2H_3NaO_2$ | zur Analyse | VWR International |
| Natriummolybdat Dihydrat | $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | zur Analyse | Fluka |
| Natrumsele nit Pentahydrat | $Na_2SeO_3 \cdot 7H_2O$ | zur Analyse | Merck |
| Nickelchlorid Hexahydrat | $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ | zur Analyse | Fluka |
| Nicotinsäure (Niacin) | $C_6H_5NO_2$ | HPLC-Grad | Merck |

Anhang

| Chemikalien | Summenformel | Reinheit | Hersteller/Vertrieb |
|---------------------------|---------------------------|-------------------|---------------------|
| Pantothenat (Vitamin B5) | $C_9H_{17}NO_5$ | unbekannt | Sigma |
| Pyridoxamin (Vitamin B6) | unbekannt | reinst | Sigma |
| RCM-Medium | unbekannt | für Mikrobiologie | MerckMillipore |
| Resazurin (Natriumsalz) | $C_{12}H_7NO_4Na$ | 80 % | Sigma |
| Rhamnose, L(-) Monohydrat | $C_6H_{12}O_5 \cdot H_2O$ | zur Analyse | Aldrich |
| Salzäure (25 %) | HCl | 25 % | Riedel deHäen |
| Stickstoff | N_2 | 5.0 | Linde/AirLiquide |
| Thiamin Hydrochlorid | $C_{12}H_{18}Cl_2N_4OS$ | unbekannt | Sigma |
| Trypton | unbekannt | für Mikrobiologie | Sigma |
| Wasserstoff | H_2 | 5.0 | Linde/AirLiquide |
| Xylose, D(+) | $C_5H_{10}O_5$ | 98 % | Fluka |
| Zinkchlorid | $ZnCl_2$ | zur Analyse | Merck |

Danksagung

Ein großer Dank geht an Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop für die Überlassung des interessanten Themas, die Anregungen, Ideen, die konstruktive Kritik, die zur Durchführung der Arbeit sehr hilfreich war und natürlich für die Begutachtung des Manuskriptes.

Prof. Dr. Adrian Schumpe danke ich für die Bereitschaft zur Übernahme des Koreferates. Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Udo Rau für die Mitwirkung als Vorsitzender der Prüfungskommission.

Ich danke besonders Dr. Thomas Willke und Dr. Anja Kuenz für ihr offenes Ohr, ihre fachliche Unterstützung, die vielen Anregungen und Diskussionen sowie für ihre hilfreichen Anmerkungen beim Verfassen des Manuskriptes.

Ein Dank auch an alle Mitarbeiter des Thünen-Institutes, für das herzliche Klima sowie für die Diskussionen und Hilfestellungen, sei es im Labor, beim Seminar oder in der Werkstatt. Im Einzelnen sind dies: Dr. Nico Anders, Memet Aytemir, Dr. Susann Baumert, Birthe Bogunovic, Jans Büüs, Liselotte Bruhn-Kaczmarek, Henry Caspary, Martin Ciaston, Michaela Grau, Dr. Theresia Umi Harwati, Julia Hellert, Marina Heuer, Antje Hevekerl, Heike Horn, Diana Hortig, Lothar Jurczyk, Norman Kaufmann, Monika Klick, Silvia Klotz, Dr. Hendrik Krauter, Susan Krull, Henning Kuhz, Gianfranco Laurenzano, Hiltrud Nilson, Jörn Oetken, Ava Prieß, Dr. Ulf Prüße, Katrin Riedmann, Dr. Anne Katrin Ringel, Dr. Heinz Stichnothe, Dr. Henning Storz, Linda Teevs und Dr. Erik Wilkens.

Ein Dankeschön geht auch an Dennis Jäger, für die Hilfe bei analytischen Fragestellungen, sein offenes Ohr und für die entstandene Freundschaft.

Dem BMELV und der FNR danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Zu guter Letzt danke ich meiner lieben Familie für die jahrelange Unterstützung und meinen Freunden für die nötige Ablenkung.